BAND 37, HEFT 3 JANUAR 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi †, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 48 Abbildungen

1960
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 37 **Heft 3** *S. 217—320 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

NSP
RAM
MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
4 FEB 1960

INHALT

Abhandlungen

ULLRICH, J., Untersuchungen zur Beurteilung der Resistenz von Kartoffelsorten gegenüber *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Mit 12 Abb. 217

BOCHOW, H., Zur Anwendung des Wurzelhaarinfektionstestes bei *Plasmodiophora brassicae* Wor. Mit 7 Abb. 236

BEHR, L., *Stemphylium botryosum* Wallr. als Erreger einer Lagerfäule am Apfel in Deutschland. Mit 4 Abb. 245

SABET, K. A., and W. J. DOWSON, Bacterial Leaf Spot of Sesame (*Sesamum orientale* L.). With 3 Fig. 252

COSTA, A. S., and A. M. CARVALHO, Mechanical Transmission and Properties of the *Abutilon* Mosaic Virus. With 4 Fig. 259

BOSSI, R., Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase. Mit 17 Abb. 273

Kurze Mitteilung

BLUMER, S., Echter Mehltau auf Süßkirschen (*Prunus avium* L.) und Zwetschgen (*Prunus domestica* L.). Mit einer Abb. 317

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photogebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/Main, Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 26,80 DM **Einzelpreis 29,50 DM**

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für Botanik, Braunschweig

Phytopathologische Zeitschrift, Band 37

Berichtigungen

Heft 1 (Arbeit KRCZAL)

Auf Seite 6, Abbildung 3, I, muß der Bruch über der Säule für Monat Dezember 1958 nicht $^{13}/_{3}$ sondern $^{43}/_{3}$ heißen.

Heft 2 (Arbeit TOMIYAMA et al.)

a) Auf Seite 119 muß der Anfang der 2. Zeile nicht seventy h o u r s sondern seventy d a y s heißen.

b) Auf Seite 133 muß in der 8. Zeile von unten cyanide-s e n s i t i v e durch cyanide-r e s i s t a n t ersetzt werden.

[illegible] hatte sich KOHLER in einer Reihe von Arbeiten mit dem Kartoffelkrebs befaßt und gemeinsam mit LEMMERZAHL schließlich ein Laboratoriumsverfahren für die Prüfung von Kartoffelsorten und -stämmen auf Krebsfestigkeit entwickelt (10, 11, 12). In der Folgezeit stellte man sich in Deutschland völlig auf diese Laboratoriumsprüfung ein, da den Feldprüfungen ohnehin stets zahlreiche, nicht zu überwindende Mängel anhaften.

Bei den Prüfungen im Laboratorium bereitete jedoch die Beurteilung der an der Grenze von „krebsfest" und „krebsanfällig" stehenden Sorten und Stämme stets eine gewisse Schwierigkeit. Unter „krebsfest" ordnete man nämlich auch Sorten ein, die unabhängig davon, daß der Pilz bei ihnen eindringen und sogar zur vollen Entwicklung gelangen kann, im Feldanbau keine Wucherungen bilden, während unter „krebsanfällig" Sorten verstanden wurden, die im Felde Wucherungen, gleich welcher Größe und Häufigkeit, bildeten. Man muß daher zwischen dem Resistenzgrad einer Sorte und ihrem Ver-

mögen, Wucherungen zu bilden, also ihrem Reaktionsgrad, unterscheiden. Die Grenzstellung gewisser Sorten kommt somit auf verschiedene Weise zustande. Die Resistenz einer Sorte kann so groß sein, daß trotz eines starken Wucherungsvermögens die Folgeinfektionen nicht ausreichen, um die Bildung von Wucherungen auszulösen. Es kann aber auch das Wucherungsvermögen derart vermindert sein, daß trotz geringer Resistenz keine Wucherungen gebildet werden. Schließlich ist es möglich, daß sowohl die Resistenz als auch das Wucherungsvermögen herabgesetzt sind. Wenn auch bei LEMMERZAHL in dieser Hinsicht Hinweise zu finden sind (12), so steht doch eine eingehende Analyse der Grenztypen noch aus. Wir hoffen daher, mit unseren Untersuchungen einen Beitrag zu der Frage der Beurteilung von Grenzsorten liefern zu können.

I. DIE BEFALLSDICHTE BEI KARTOFFELSORTEN VERSCHIEDENEN RESISTENZGRADES (STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN)

1. Methoden

Zur Infektion der Kartoffel mit *S. endobioticum* werden nach LEMMERZAHL (12) aus den zu prüfenden Knollen etwa 3 × 3 cm große Augenstücke herausgeschnitten, deren Keim etwa 1 mm lang ist. Um das Auge wird mit einem Pinsel ein Ring aus flüssiger Vaseline gezogen und innerhalb des Ringes destilliertes Wasser aufgetropft, in das dann Stücke von Krebswucherungen gelegt werden.

Bei der Befallsdichte, die 14 Tage nach der Infektion ermittelt wird, unterscheiden wir vereinzelte, zerstreute und dichte Infektionen. Unter vereinzelter Infektion werden bis zu fünf Infektionen auf einem Kartoffeltrieb verstanden. Ist die Häufung der Infektionen so dicht, daß ein „Infektionsfeld" zustande kommt, wie das aus den Abbildungen 3 und 4 ersichtlich ist, so sprechen wir von dichter Infektion. Zwischen diesen beiden Extremen liegt der zerstreute Befall. Diese Einteilung deckt sich annähernd mit der Einstufung von LEMMERZAHL (12).

Zur Bonitierung bedienen wir uns folgender Kurzzeichen: g = vereinzelte Radiärgallen, gg = zerstreut auftretende Sori mit Gallbildung, ++ = zerstreut auftretende Sori mit schwacher oder fehlender Gallbildung, entsprechend bei dichter Infektion ggg oder +++. Abortionen[1]) werden in gleicher Weise nach der Dichte mit a, aa oder aaa angegeben. Treten Abortionen neben Sori oder Dauersporen mit oder ohne Gallbildung auf, was gelegentlich der Fall ist, so ergeben sich entsprechende Kombinationen wie ag, a+, aag, agg, aa+ und a++. Unter Sori werden in den Tabellen sowohl Sommersori wie Dauersporen verstanden, da beide Formen mit der Lupe nicht unterschieden werden können. Das Gallbildungsvermögen brauchte bei den unseren Tabellen zugrunde liegenden statistischen Erhebungen nicht berücksichtigt zu werden.

[1]) Unter „Abortion" werden Nekrosen der infizierten Wirtszelle oder ihrer Umgebung verstanden.

2. Das Wesen der Resistenz bei *Synchytrium endobioticum* nach KÖHLER und GÄUMANN

Es hat sich die Auffassung eingebürgert, daß bei der Kartoffel die Resistenz gegenüber *Synchytrium endobioticum* auf einer hyperergischen Abwehrreaktion beruht. Das heißt, daß eine Eindringungsresistenz nicht besteht, auch die normergische Abwehr des Wirtes nicht ausreicht und der Resistenzgrad durch den Umfang nekrogener Abortion der Infektionen bestimmt wird. Diese auf KÖHLER zurückgehenden Vorstellungen haben GÄUMANN veranlaßt, einen entsprechenden „*Synchytrium*-Typ" aufzustellen (2, S. 391—400). Wir werden daher zunächst zu prüfen haben, ob diese Auffassung berechtigt ist.

Nach KÖHLER dringen die Schwärmer von *S. endobioticum* bei allen Kartoffelsorten in gleicher Häufigkeit ein. Verschieden ist nur das weitere Schicksal des eingedrungenen Parasiten, entweder kommt es früher oder später zu einer nekrogenen Abortion, oder es entwickelt sich ein reifer Sorus. KÖHLER hatte 1931 auf Grund dieser Vorstellung das Verhalten der Kartoffelsorten verschiedenen Resistenzgrades nach folgenden Stufen bewertet (10):

Tabelle 1

Resistenzstufen nach KÖHLER

Stufe I	Alle oder fast alle Sori abortiert. Einzelne oder zerstreute unversehrte Sori gelegentlich noch an den jüngsten infizierten Organen vorhanden. Die nekrotischen Stellen häufig abgestoßen und nur noch in Spuren vorhanden.
Stufe II	Weitaus der größte Teil der Sori abortiert. Nur an den oberen infizierten Blättern und Stengelteilen noch intakte Sori, manchmal in größerer Zahl vorhanden. Die Nekrosen im großen und ganzen deutlich erhalten.
Stufe III	Sori an den oberen infizierten Blättern und in der oberen und mittleren Stengelregion der Volltriebe größtenteils noch intakt. Die meist sehr auffälligen Nekrosen vorwiegend auf die Stengelbasis und die unteren Blätter beschränkt. Raschwüchsige, stark infizierte Nebentriebe gewöhnlich ohne Nekrosen.
Stufe IV	Sori überwiegend intakt. Ausgedehntere Nekrosen fast nur an den untersten Blättern.
Stufe V	Nekrosen völlig fehlend oder nur in Spuren vorhanden. Alle oder fast alle Sori voll entwickelt.

Diese Skala sollte das Bild der unterschiedlichen Infektionsgrade wiedergeben, wobei KÖHLER im „Infektionsgrad" nur ein Maß für die voll entwickelten Parasiten, aber nicht für die Zahl aller Infektionen sah.

Hierbei waren jedoch Beobachtungen unbeachtet geblieben, die KÖHLER selbst mit LEMMERZAHL (11) und LEMMERZAHL allein (12) kurz zuvor bekanntgegeben hatten. Diese Beobachtungen vermittelten ein anderes Bild von dem

Resistenzverhalten einer Sorte, da bei krebsfesten Sorten nur vereinzelte Infektionen auftraten, bei krebsanfälligen jedoch überwiegend dichte Infektionen. Danach bestimmte neben den nekrogenen Abortionen auch die Befallsdichte den Resistenzgrad einer Sorte. HEY ist später dieser Auffassung gefolgt und hat ebenfalls für krebsanfällige Sorten eine höhere Befallsdichte angenommen als für krebsfeste (3). Er verstand weiterhin im Gegensatz zu KÖHLER unter Infektionsgrad treffender die Zahl der Infektionen, die sich aus der Zahl der reifen Sori (bereits bei KÖHLER als „Vollinfektionen" bezeichnet) und der Abortionen zusammensetzt:

Tabelle 2

Infektionsgrad bei krebsanfälligen und krebsfesten Sorten nach HEY

Infektionsgrad	krebsanfällige Sorten	krebsfeste Sorten
Befallsdichte	hoch (bis 100 %)	gering (bis 30 %)
Vollinfektionen	häufig	selten
Abortionen	selten	vereinzelt bis häufig, Frühabortionen ohne Symptome

HEY lieferte für die von ihm beobachtete unterschiedliche Befallsdichte bei beiden Sortengruppen kein Zahlenmaterial.

3. Die Befallsdichte bei hochresistenten („krebsfesten") und schwach resistenten („krebsanfälligen") Sorten mit starkem Wucherungsvermögen

Für die Ermittlung der unterschiedlichen Befallsdichte bei beiden Sortengruppen liegt nur bei LEMMERZAHL ein auswertbares Zahlenmaterial vor (12). Er verglich 40 krebsanfällige und 29 krebsfeste[1]), nach seiner Methode infizierte Sorten miteinander. Aus seinen Tabellen lassen sich folgende Ergebnisse berechnen:

Tabelle 3

Befallsdichte krebsanfälliger und krebsfester Sorten nach LEMMERZAHL

	Knollenstücke					
	Zahl	% befallen	% mit Sori			% Abortionen
			dicht	zerstreut	vereinzelt	
krebsfeste Sorten	387	5,4	0	0	2,4	3,0
krebsanfällige Sorten	521	59,2	45,2	9,2	4,6	0,2

[1]) Sofern nicht nähere Angaben gemacht werden, handelt es sich stets um das Verhalten gegenüber Rasse 1 (Rassennomenklatur siehe [13]).

Hieraus geht hervor, daß in LEMMERZAHLS Untersuchungen die Zahl der Abortionen bei den krebsfesten Sorten in keinem Verhältnis zu der Zahl der Sori bei den krebsanfälligen Sorten stand, was nach den eingangs geschilderten Vorstellungen KÖHLERS zu fordern wäre. Es ist zwar denkbar, daß eindringende Parasiten bei den krebsfesten Sorten durch eine normergische Abwehrreaktion des Wirtes zugrunde gehen, daß also, wie auch HEY annimmt, Frühabortionen ohne Symptome vorkommen. Entsprechende Vorstellungen hatte schon CARTWRIGHT entwickelt (1). KÖHLER hielt diese Art der Abortion aber für nicht erwiesen (9).

Wir haben nun seit Mitte Januar 1959 bei den der amtlichen Kartoffelkrebshauptprüfung unterworfenen Zuchtstämmen die Dichte der Sori und der Abortionen nach den 3 Stufen „vereinzelt — zerstreut — dicht" bonitiert. Traten Abortionen und Sori auf dem gleichen Triebe auf, so wurden diese Proben entsprechend der Soridichte eingeordnet. Diese Fälle sind jedoch recht selten. Da die Zuchtstämme vorher bereits in der Krebsvorprüfung von zwei anderen Prüfstellen auf Krebsresistenz grob ausgelesen worden waren, ist der Anteil krebsanfälliger, d. h. schwach resistenter Stämme von insgesamt acht nur gering. Ihnen stehen 58 krebsfeste, d. h. hoch resistente Stämme gegenüber. Von dem gesamten seit Mitte Januar geprüften Material wurden lediglich einige wenige schlecht keimende und stark mit *Rhizoctonia* befallene Proben ausgeschieden.

Tabelle 4

Befallsdichte krebsanfälliger und krebsfester Sorten nach eigenen Untersuchungen

	Knollenstücke							
	Zahl	% befallen	% mit Sori*)			% mit Abortionen*)		
			dicht	zerstreut	vereinzelt	dicht	zerstreut	vereinzelt
krebsfeste Stämme	792	87,0	0	0,2	3,1	0,1	4,7	78,9
krebsanfällige Stämme	109	86,3	14,7	32,1	24,8	0	0	14,7

*) Berechnet als % der befallenen Knollenstücke.

Da wir im Gegensatz zu LEMMERZAHL in anderer Weise infizieren (14), erreichen wir, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, weit höhere Befallsprozente als LEMMERZAHL (Tabelle 3). Diese überschritten 85 % auch bei den krebsfesten Stämmen, die also in gleichem Maße infizierbar waren wie die krebsanfälligen Stämme. Daher sind nun auch beide Gruppen bezüglich des Infektionsgrades miteinander vergleichbar. Obwohl sich der höhere Infektionserfolg bei den krebsfesten Stämmen, wie zu erwarten, in einer erhöhten Zahl der Abortionen auswirkte, wurde jedoch eine höhere Infektionsdichte nicht erreicht. Auch traten bei den krebsanfälligen Sorten mehr vereinzelte Abortionen als in den Versuchen von LEMMERZAHL auf. Ebenso ist die Zahl vereinzelter Sori erhöht.

Aus Tabelle 4 ließen sich folgende Infektionsgrade (Sori + Abortionen) berechnen, wobei dichter und zerstreuter Befall dem vereinzelten gegenübergestellt und die Zahl der befallenen Knollenstücke gleich 100 gesetzt wurde:

	Infektionen		
	dicht	zerstreut	vereinzelt
Krebsfeste Stämme	0,1	5,8	94,1
Krebsanfällige Stämme	17,0	37,2	45,8

Hieraus geht nun völlig eindeutig hervor, daß bei krebsfesten Stämmen weit weniger sichtbare Infektionen auftreten als bei krebsanfälligen Stämmen. Ob tatsächlich weniger Schwärmer eindringen oder ob es Frühabortionen ohne Symptome gibt, kann vorerst nicht entschieden werden.

4. Die Befallsdichte bei schwach resistenten Sorten mit vermindertem Wucherungsvermögen

KÖHLER hatte 1931 bereits darauf hingewiesen, daß es durchaus möglich sei, einmal eine hochanfällige Sorte zu finden, die keine Wucherungen bildet (9). Eine solche Sorte müßte bei feldmäßiger Prüfung daher als „krebsfest" angesprochen werden. Unter den damals bekannten 56 feldresistenten Sorten konnte KÖHLER schließlich die Sorten Roland I und Blaue Gelbfleischige auffinden, die sich dementsprechend verhielten. Diese Sorten existieren heute nicht mehr. Wir prüfen an der Biologischen Bundesanstalt jährlich bis zu 300 Sorten und Zuchtstämme auf Resistenz gegenüber verschiedenen Krebsrassen, wobei über 10 000 Knollenstücke infiziert und bonitiert werden. Hierbei konnten wir bisher nur zwei Sorten dieses Typs auffinden. Es handelt sich um die holländische Sorte Urgenta bei Infektion mit Rasse 1 und die deutsche Sorte Susanna bei Infektion mit Rasse 2.

Die Sorte Urgenta wird als krebsfeste Sorte im holländischen Sortiment geführt. Bisher ist nichts über einen Befall mit Rasse 1 bekanntgeworden. Auch die Sorte Susanna wurde zweimal in zwei verschiedenen Herden der Rasse 2 angebaut und blieb befallsfrei. Bei beiden Sorten ist das Wucherungsvermögen sehr stark vermindert.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei der holländischen Sorte Roode Star. Auch sie ist hochanfällig, sie hat jedoch wegen ihres verringerten Wucherungsvermögens früher eine widersprechende Beurteilung erfahren. Sie wurde in Deutschland an zwei verschiedenen Stellen im ganzen sechsmal feldmäßig geprüft und davon zweimal als schwach befallen und viermal als nicht befallen gemeldet. Eine deutsche, mit dieser Sorte morphologisch völlig übereinstimmende „Staudenauslese" wurde an vier verschiedenen Stellen im ganzen neunmal feldmäßig geprüft und jedesmal als nicht befallen gemeldet (8). In England galt sie zunächst als krebsfest, wurde aber schließlich im Feldversuch ebenso wie in Holland befallen, während die synonyme

französische Sorte Etoile du Nord stets als anfällig galt (12). „Roode Star" wird daher heute als krebsanfällig bezeichnet.

Tabelle 5

Befallsdichte bei zwei Sorten verminderten Wucherungsvermögens im Vergleich mit krebsanfälligen Zuchtstämmen

	Knollenstücke							
	Zahl	% befallen	% mit Sori*)			% mit Abortionen*)		
			dicht	zerstreut	vereinzelt	dicht	zerstreut	vereinzelt
Urgenta	28	85,6	8,3	29,2	16,7	8,3	29,2	8,3
Roode Star	15	87,0	7,5	38,5	15,5	0	15,5	23,0
krebsanfällige Stämme	109	86,3	17,0	37,2	28,8	0	0	17,0

*) Zur Berechnung wurde die Zahl der befallenen Knollenstücke = 100 gesetzt.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, war die Befallsdichte bei der Sorte Urgenta kaum geringer als die bei krebsanfälligen Stämmen. 16,6 % dichte Infektionen in der Form von Sori und Abortionen stehen 17,0 % bei den Zuchtstämmen gegenüber, nur war eben die Hälfte dieser Dichtinfektionen abortiert. Sehr hoch war auch der Anteil der zerstreuten Abortionen. Die Ursache ist darin zu suchen, daß die anfällige Phase bei dieser Sorte sehr kurz ist. Als Folge der raschen Verschiebung der Disposition konnten wir oft beobachten, daß der Hauptkeim eines Auges dichte Abortionen aufwies, während die Seitenknospen dicht mit Sori besetzt waren. Der Anteil der Kartoffelkeime, die einen dichten Sorusbesatz aufwiesen, ist hoch genug, um die Sorte als nur schwach resistent auszuweisen. Gleiches gilt für die Sorte Susanna, die Befallsdichte wird deutlich durch Abbildung 4 demonstriert.

Auch bei „Roode Star" trat noch in nennenswertem Umfang dichter Sorusbesatz auf. Der Umfang der Abortionen wird auch hier in starkem Maße von der Disposition der Epidermis des Keimes zum Zeitpunkt der Infektion bestimmt. LEMMERZAHL beobachtete bei dieser Sorte keine Abortionen (12), in anderen Infektionsserien war auch in unseren Versuchen der Anteil an Abortionen gering oder sie fehlten ganz. Auch bei der Sorte Roode Star ist die Resistenz gering; die Ursache für ihre Stellung als Grenzsorte ist daher in einer Verminderung des Wucherungsvermögens zu suchen, wenn diese auch nicht so weit geht wie bei „Urgenta" und „Susanna".

5. Die Befallsdichte bei Sorten mit mittlerer Resistenz und starkem Wucherungsvermögen

Im Jahre 1954 wurden in einem Krebsherd im Bayrischen Wald, in einem Gebiet mit Jahresniederschlägen von über 1000 mm, bei Versuchen der Bayrischen Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz die Sorte

Virginia befallen. Bei etwa 5 % der Stauden traten kleine Wucherungen auf. Zum Vergleich angebaute weitere 29 Sorten wurden nicht befallen. Die Vermutung, daß hier eine neue Rasse des Erregers auftrat, lag nahe, ließ sich aber nicht bestätigen. Die Sorte Virginia ist 1946 in den Wirren des ersten Nachkriegsjahres durch die amtliche Krebsprüfung gegangen und als krebsfest erklärt worden. Geprüft wurde damals ein nicht amtlich gezogenes und kontrolliertes Knollenmaterial. Die amtliche Sortenzulassung erfolgte 1950.

JANEŽIC berichtete 1958 über ein Kartoffelkrebsauftreten in Slowenien (5). Hier wurden 113 krebsfeste und krebsanfällige Sorten angebaut. Von den „krebsfesten" Sorten wurde nur „Virginia" befallen, und zwar drei Jahre nacheinander. Die Wucherungen waren meist klein, konnten aber auch „mehr als Nußgröße" erreichen. Der Befallsherd wies alle den Kartoffelkrebs begünstigenden ökologischen Bedingungen auf: Niederschlag im zehnjährigen Durchschnitt 1895 mm (!), durchschnittliche Jahrestemperatur 6,2 °C, Julitemperaturmittel 15,3 °C, Bodenazidität etwa pH 5. Hier wurde angenommen, daß eine neue Rasse vorliege, „die nur wenig aggressiver ist als der gewöhnliche Krebs", obgleich die bisher gegenüber allen neuen Rassen anfällige Sorte Ackersegen befallsfrei blieb.

Wir haben „Virginia" 1959 auf dem Braunschweiger Krebsfeld angebaut. Wegen der großen Trockenheit wurde die Parzelle stets ausreichend bewässert. An den acht Stauden waren insgesamt 3 Knollen befallen. In den nur wenige Millimeter großen Wucherungen konnten Dauersporen nachgewiesen werden.

In unseren Laboratoriumstesten konnten wir feststellen, daß das Symptombild bei der holländischen Sorte Ambassadeur große Ähnlichkeit mit dem der Sorte Virginia hatte (s. Abschnitt II/2). Krebsbefall ist bei dieser in Holland und Frankreich als krebsfest geltenden Sorte noch nicht festgestellt worden.

Tabelle 6

Befallsdichte bei zwei Sorten verminderten Resistenzgrades

	Knollenstücke							
	Zahl	% befallen	% mit Sori*)			% mit Abortionen*)		
			dicht	zerstreut	vereinzelt	dicht	zerstreut	vereinzelt
Virginia	47	91,5	0	14,0	67,5	2,5	2,5	14,0
Ambassadeur	37	94,5	0	22,9	28,6	0	2,8	45,7

*) Zur Berechnung wurde die Zahl der befallenen Knollenstücke = 100 gesetzt.

Wir haben diese beiden Sorten mit bestem Tumorenmaterial infiziert und erreichten einen Befall von über 90 % (Tab. 6). Nur bei „Virginia" traten in wenigen Fällen abortierte Dichtinfektionen auf, ein dichter Sorusbesatz war bei beiden Sorten nicht mehr vorhanden. Auch der Anteil zerstreuter Infektionen ist gegenüber den anfälligen Stämmen der Tabelle 5 verringert. Wir haben es daher mit Sorten mittlerer Resistenz zu tun.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Untersuchungen

Für die Resistenz einer Sorte ist in erster Linie die Befallsdichte entscheidend, in zweiter erst das Vermögen, Infektionen nekrotisch zu abortieren. Daher ist die Auffassung von KÖHLER und GÄUMANN, daß das Wesen der Resistenz der Kartoffel gegenüber *S. endobioticum* in der nekrogenen Abwehrreaktion zu suchen ist, nicht zutreffend. Bei Sorten geringen Resistenzgrades treten stets Dichtinfektionen auf, mit der Erhöhung der Resistenz bleiben dichte Infektionen aus, schließlich kann auch der Anteil zerstreuter Infektionen geringer werden. Bei hochresistenten Sorten wird nur noch ein vereinzelter Befall beobachtet (s. schematische Darstellung Abb. 1).

Während hochresistente Sorten auch „krebsfest" sind, ist für die „Krebsfestigkeit" oder „Krebsanfälligkeit" der Sorten geringer oder mittlerer Resistenz neben dem Wucherungsvermögen das Ausmaß von Folgeinfektionen entscheidend.

II. DAS WUCHERUNGSVERMÖGEN DER SORTEN SCHWACHER UND MITTLERER RESISTENZ (MORPHOLOGISCH-ANATOMISCHE UNTERSUCHUNGEN)

1. Methoden

Die nach dem modifizierten Lemmerzahl-Verfahren infizierten Kartoffelkeime wurden 14 Tage nach der Beimpfung in Alkohol-Eisessig 3 : 1 fixiert und über die Alkoholreihe und Chloroform in Paraffin (4 T. Paraffin, Erstarrungspunkt 56 bis 58 °C, 2 T. Paraffin, Erstarrungspunkt 52 bis 53 °C, und 0,8 T. Bienenwachs) eingebettet. Geschnitten wurde mit einem großen Schlitten-Mikrotom, Schnittdicke 10 bis 12 μ. Die Schnitte wurden in bekannter Weise mit Kongorot gefärbt und in Caedax eingeschlossen.

2. Untersuchungen

Wir benutzten zur Anzucht von Wucherungsmaterial für die Infektion bei der Rasse 1 die Sorte Deodara. Einen nicht infizierten 14 Tage alten Dunkelkeim dieser Sorte zeigt Abbildung 2. Der Unterschied zwischen Dunkelkeimen dieses Alters bei verschiedenen Sorten ist nicht allzu groß. Daher kann diese Abbildung dem Vergleich mit den Bildern befallener Keime anderer Sorten dienen. „Deodara" besitzt ein hohes Wucherungsvermögen und stellt in dieser Beziehung ebenso ein Extrem dar, wie auf der anderen Seite die Sorten Susanna und Urgenta. Vergleicht man das Befallsbild der Sorten Deodara und Susanna 14 Tage nach der Beimpfung miteinander, so fällt auf, daß bei beiden bestimmte Bezirke des Keimes dicht mit Parasiten besetzt sind, andere jedoch völlig frei bleiben (Abb. 3, 4). KÖHLER und LEMMERZAHL nahmen an, daß die aus einem Sporangium entleerten Schwärmer nur eine ziemlich eng umschriebene Fläche des Wirtsorganes infizieren. Eine derartige

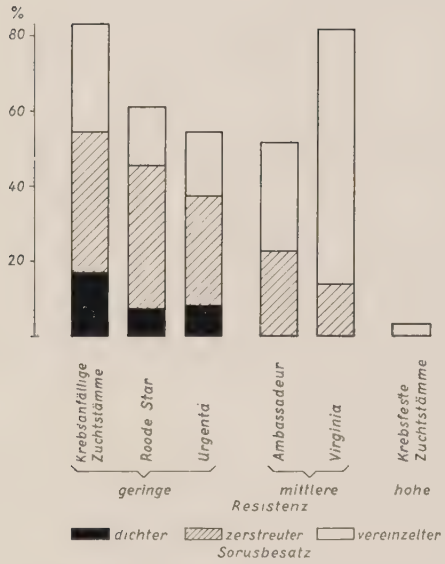


Abb. 1. Soridichte in Prozent bei Kartoffelsorten und -stämmen unterschiedlicher Resistenz gegenüber *Synchytrium endobioticum*

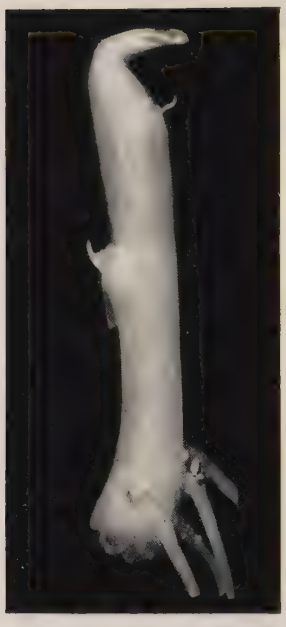


Abb. 2. Deodara. 14 Tage alter, nicht infizierter Keim (3×).
(Bild BBA Braunschweig)

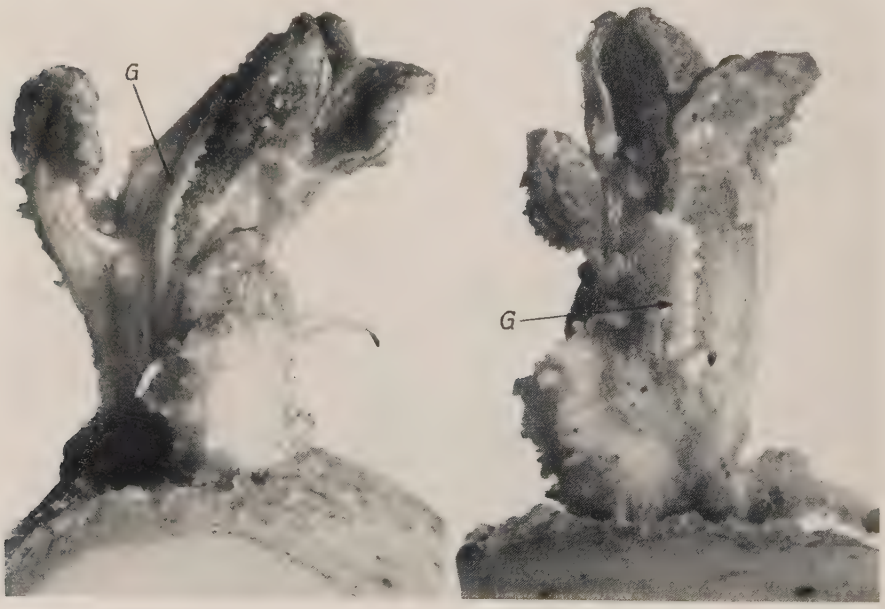


Abb. 3. Deodara. Keim, 14 Tage nach der Beimpfung mit *S. endobioticum*, Rasse 1. Rechts gegenüber links um 90° gedreht. Infektionsfelder mit Umwallungen (G). (6×).
(Bild BBA Braunschweig)

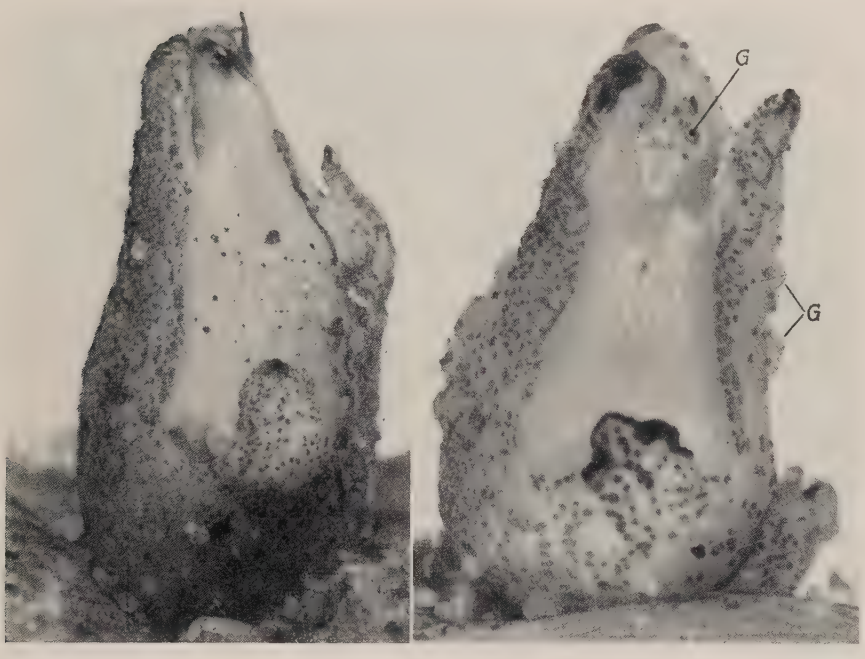


Abb. 4. Susanna. Zwei Keime, 14 Tage nach der Beimpfung mit *S. endobioticum*, Rasse 2. Rechts schwache Gallbildung bei vereinzelten Infektionen (G). (6×).
(Bild BBA Braunschweig)

Stelle, deren Grenzen durch den Aktionsradius der Schwärmer festgelegt sind, bezeichneten sie als Infektionsbezirk. Bei Keimung benachbarter Sporangien sollten dann zusammengesetzte Infektionsbezirke zustande kommen (11).

Wir können diese Beobachtungen nicht bestätigen. Auch bei Infektionsversuchen mit großen Flüssigkeitsmengen an Kartoffeln (unveröffentlicht) und an Tomaten (4) konnte ein dichter Befall beobachtet werden, der Aktionsradius der *Synchytrium*-Schwärmer kann also recht groß sein. Wenn dennoch begrenzte Infektionsbezirke entstehen, so sind die Ursachen anderer Art. Wie aus den Befallsbildern beider Sorten zu ersehen ist, bleiben offensichtlich jene Stellen am Sproß befallsfrei, die zur Zeit der Infektion von Blättern bedeckt und daher den Schwärmern nur schwer oder gar nicht zugänglich waren. Eine Querschnittfolge durch den jungen Keim zur Zeit der Infektion zeigt deutlich, daß die Blättchen ± dicht an der Achse anliegen (Abb. 5). Daher sind beim Schnitt durch eine Knospe die Infektionen auch nur an den leicht zugänglichen Stellen der Achse zu finden (Abb. 6).

Abb. 5. Deodara. Querschnittfolge durch eine Knospe im Zeitpunkt der Infektion (schematisch)

Nach Köhler entstehen bei Einzelinfektionen Radiärgallen, diese werden durch einen Kranz von Höckern gebildet, die rund um die Wirtszelle ste-

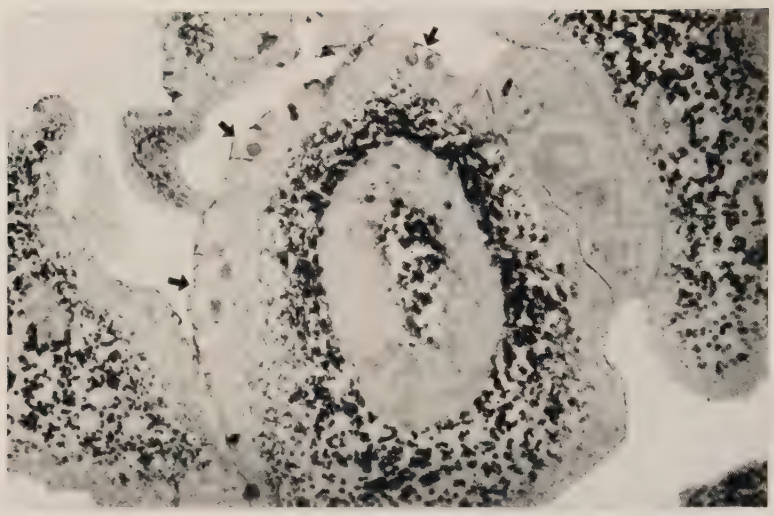


Abb. 6. Urgenta. Querschnitt durch eine Knospe mit lokalen Infektionen (→). Erklärung siehe Text. (100×). (Bild BBA Braunschweig)

hen. Bei Dichtinfektionen soll, wie KÖHLER erwähnt, diese Höckerbildung auf die Randzone des infizierten Areals beschränkt sein (9). Betrachtet man nun infizierte Triebe von „Susanna", so findet man bei vereinzelten, außerhalb der Infektionsfelder liegenden Sori Radiärgallen, am Rande der Infektionsfelder sind aber keinerlei Gallbildungen zu erkennen (Abb. 4, G). Im Gegensatz zur Sorte Susanna finden wir jedoch bei „Deodara" an diesen Stellen deutliche „Wucherungen" (Abb. 3, G). Es handelt sich dabei aber nicht um einzelne Höcker, sondern um einen von Zähnen gekrönten Wall (Abb. 7). Im Querschnitt erweist sich, daß diese „Zähne" nach innen eingerollt und zum Teil auch gegabelt sein können. Auf den Blättchen des Keimes können besonders vielgestaltige Anhangsgebilde entstehen, wie Abbildung 8 erkennen läßt.

Die Infektionsfelder sind bei beiden Sorten kaum mit Sommersori, sondern vielfach ausschließlich mit Dauersporen besetzt. Es ist ausdrücklich zu vermerken, daß dennoch bei „Deodara" an den Rändern dieser Felder Wucherungen gebildet werden. Hierbei entsteht nicht nur die von KÖHLER beschriebene, für den Dauersporenbefall typische „Epidermisgeschwulst", die eine zellreiche Wucherung subepidermalen Gewebes darstellt; es finden sich auch

Abb. 7. Deodara. Querschnitt durch ein Infektionsfeld des Keimes der Abbildung 3, EG = „Epidermisgeschwulst" U = Umwallungen (schematisch). (20×)

jene Gebilde am Rande des Infektionsfeldes, die man den Höckern der Einzelgalle gleichsetzen muß und die nach KÖHLER ausschließlich im Bereiche der Sommersori entstehen sollen. Die „Epidermisgeschwulst" ist bei „Deodara" sehr mächtig. Das ganze aus dieser Geschwulst und ihren Anhängern bestehende Gebilde führt ein eigenes Leitgewebe. Die sogenannte Epidermisgeschwulst wurde von KÖHLER bei der Sorte Rubia beschrieben und abgebildet (7). Hier fehlen die Anhangsgebilde, was aber verständlich ist, denn „Rubia" war eine Sorte, von der KÖHLER ausdrücklich feststellte, daß die Gallreaktion bei ihr sehr schwach war und bei der selbst im Bereich der Sommersori keine Höckerkränze entstanden.

Abb. 8. Deodora. Gallbildungen auf einem Blättchen des Keimes der Abbildung 3 (75×). (Bild BBA Braunschweig)

Bei der Sorte Susanna fehlen die Umwallungen des Infektionsfeldes. Hier wird aber auch die Geschwulst als Folge des Dauersporenbefalles nicht mehr ausgebildet, es entstehen nur wenige Zellagen, in die die Synchytrien eingelagert sind (Abb. 9). Von einem Wucherungsvermögen kann hier kaum noch gesprochen werden, allenfalls werden an den Rändern der Infektionsfelder schwache Ausbuchtungen gebildet. Die Fähigkeit, bei Einzelinfektionen Radiärgallen zu bilden, ist allerdings noch erhalten geblieben. Wie schon KÖHLER richtig erkannte, hat sie jedoch mit dem eigentlichen Wucherungsvermögen einer Sorte wenig zu tun (10). Radiärgallen können auch auf hochresistenten Sorten bei den gelegentlich auftretenden Einzelinfektionen entstehen.

Zwischen den hier dargestellten extremen Typen gibt es bezüglich des Wucherungsvermögens Übergänge. Das geht schon aus der unterschiedlichen Größe der im Felde bei verschiedenen Sorten gebildeten Wucherungen hervor. Diese zwischen den Extremen stehenden Typen erfordern noch ein eingehendes Studium. Aus dem Gesamteindruck, den man beim Durchmustern von Schnittserien durch infizierte Keime der Sorte Roode Star gewinnt, läßt sich ohne weiteres ein gegenüber „Deodara" verringertes Wucherungsvermögen ableiten. Es entstehen hier nicht die vielgestaltigen Anhangsgebilde, meist sind es breite, einfach gestaltete Höcker, die denen von „Deodara" bezüglich der inneren Differenzierung und äußeren Gestaltung nachstehen. Dagegen

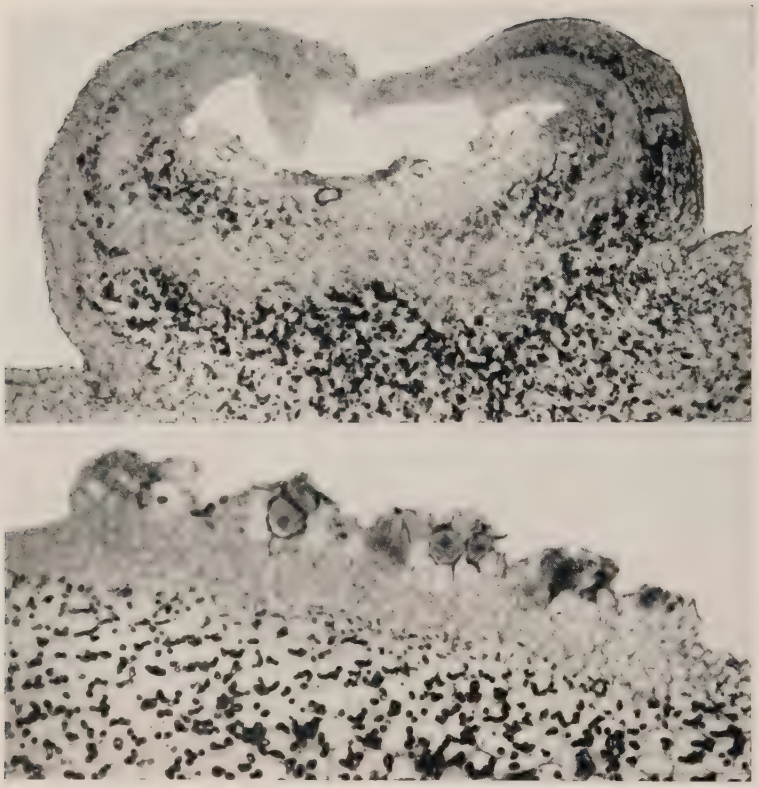


Abb. 9. Querschnitt durch ein Infektionsfeld der Sorten Deodara (oben) und Susanna (unten). (80×). (Bild BBA Braunschweig)

Abb. 10. Keime der Sorten Virginia (links) und Ambassadeur, 14 Tage nach der Beimpfung mit *S. endobioticum*, Rasse 1. (3×). (Bild BBA Braunschweig)

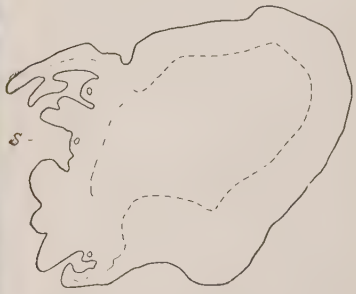


Abb. 11. Ambassadeur. Querschnitt durch einen Keim, 14 Tage nach der Beimpfung mit *S. endobioticum*, Rasse 1. Gallbildungen an der Achse, S = Sori (schematisch). (12×)

sind die Gallbildungen bei den Sorten Virginia und Ambassadeur kaum geringer als bei „Deodara“ (Abb. 11, 12). Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß hier diese Bildungen nur von wenigen Infektionen ausgelöst werden. Wie ja aus Tabelle 6 hervorging, wiesen beide Sorten nur einen vereinzelten bis zerstreuten Sorusbesatz auf. Daher ist auch das makroskopische Befallsbild ein anderes als bei „Deodara“ (Abb. 10). Bei der anatomischen Untersuchung befallener Keime 14 Tage nach der Beimpfung zeigt sich, daß beide Sorten hinsichtlich der Gallbildung weitgehend übereinstimmen. Daher muß durchaus damit gerechnet werden, daß auch „Ambassadeur“ unter günstigen Außenbedingungen im Felde Wucherungen zu bilden vermag. Wenn trotz des relativ hohen Wucherungsvermögens, wie bei „Virginia“ nachgewiesen, im Felde selten und dann auch nur sehr kleine Wucherungen gefunden werden, so ist die Ursache in der geringen Infektionsdichte zu suchen. Diese führt zu einer wesentlich geringeren Zahl von Folgeinfektionen als eine Dichtinfektion vom Typ „Deodara“.

Abb. 12. Ambassadeur. Längsschnitt durch einen Keim 14 Tage nach der Beimpfung mit *S. endobioticum*, Rasse 1. Gallbildung an der Achse. (90×). (Bild BBA Braunschweig)

3. Zusammenfassung der Ergebnisse der morphologisch-anatomischen Untersuchungen

Bei schwach resistenten Sorten sind alle den Schwärmern bei der Beimpfung zugänglichen Bezirke des Kartoffelkeimes dicht infiziert. Die Sorten Susanna und Urgenta zeigen jedoch bei Infektion mit Rasse 2 bzw. 1, im Gegensatz zur Sorte Deodara bei Infektion mit Rasse 1, ein sehr stark verringertes Wucherungsvermögen. Im Felde dürften daher diese Sorten kaum Wucherungen bilden, es ist jedoch damit zu rechnen, daß bei ihnen Dauersporen auftreten.

Die Sorten Virginia und Ambassadeur als Sorten mittlerer Resistenz besitzen ein relativ starkes Wucherungsvermögen. Wenn bei ihnen nur mit einem seltenen Auftreten kleiner Wucherungen im Felde zu rechnen ist, so ist das auf ein geringes Ausmaß an Folgeinfektionen zurückzuführen. Die Ursache hierfür ist in der bei diesen Sorten geringen Infektionsdichte zu suchen.

III. FOLGERUNGEN FÜR DIE BEURTEILUNG DER „GRENZTYPEN"

1. Die Beurteilung der schwach resistenten Sorten mit vermindertem Reaktionsvermögen

Bei den Sorten mit vermindertem Reaktionsvermögen dringen wie bei jeder anderen hochanfälligen Sorte die Schwärmer im Laboratoriumsversuch in großer Zahl ein, es entstehen Sommersori und Dauersporen. Der Anteil an Dauersporen kann sogar recht hoch sein. Die Ursache hierfür liegt nicht darin, daß deren Bildung unter den Verhältnissen der Laborinfektion mit vielen Schwärmern auf engem Raume besonders begünstigt ist. Wie an unserem Institut ausgeführte Infektionsversuche mit Tomatenkeimlingen (4), Kartoffelkeimlingen und Kartoffelsprossen (unveröffentlicht) zeigten, wobei mit einer gegenüber dem Lemmerzahl-Verfahren mehr als 100fachen Flüssigkeitsmenge gearbeitet wurde, entstehen auch dann, wenn die Schwärmer größere Strecken zurücklegen müssen, bei dichter und vereinzelter Infektion Dauersporen.

Wie steht es nun aber mit der Dauersporenbildung im Felde? Nach den derzeitigen Vorstellungen über den Entwicklungsgang von *S. endobioticum* sind nur die Schwärmer der Sommersporangien als Isogameten anzusehen und könnten daher miteinander fusionieren. Dauersporen sollten ausschließlich aus Infektionen mit den hierbei entstehenden Zygoten hervorgehen. Somit dürften sich bei alleiniger Infektion durch die aus den im Boden befindlichen Dauersporen austretenden Schwärmer auch nicht wieder Dauersporen entwickeln. Das wäre erst bei Folgeinfektionen möglich, zu denen es bei fehlender Wucherungsbildung nicht kommen kann. Diese Vorstellungen sind jedoch wenig gesichert, denn sexuelle Vorgänge sind nur bei drei *Synchytrium*-Arten beobachtet worden. Dauersporen treten jedoch bei einer großen Zahl von Arten auf. KARLING definiert daher „Dauersporen" (resting spores) als ruhende, dickwandige Stadien, unabhängig von ihrem Verhalten bei der Keimung und unabhängig davon, ob sie durch eine Fusion beweglicher Isogameten gebildet wurden oder nicht (6). Somit wird man die Möglichkeit der Dauersporenbildung im Felde doch nicht völlig verneinen können.

Eine weitere Frage ist, ob der verminderte Reaktionsgrad zur Bildung von Wucherungen ausreicht. Das Reaktionsvermögen bei „Susanna" ist äußerst gering, das gleiche gilt für „Urgenta". Es erscheint daher zumindest zweifelhaft, ob bei diesen Sorten im Felde jemals Wucherungen auftreten werden. Wegen ihrer hohen Anfälligkeit dürfte es dennoch ratsam sein, sie nicht als „krebsfest" gegenüber der jeweiligen Rasse des Pilzes zu bezeichnen. Das ist infolge der großen Seltenheit dieser Typen durchaus zu verantworten.

2. Die Beurteilung der Sorten mit mittlerer Resistenz und starkem Wucherungsvermögen

KÖHLER hat die seinerzeit „krebsfesten" Sorten nach dem Verhalten bei der Laboratoriumsprüfung in seine Skala der Resistenzstufen (Tab. 1) eingeordnet und dabei gefunden, daß ihr „Reaktionsgrad" in gewisser Weise

mit dem „Infektionsgrad" gekoppelt war. Die krebsfesten Sorten erstreckten sich, abgesehen von den beiden Sorten Roland I und Blaue Gelbfleischige, die dem Typ „Urgenta" entsprachen, von der Stufe I bis III. HEY hat jedoch mit einem anderen Sortiment und mit der Krebsrasse 2 gezeigt, daß sich bei Anwendung der gleichen Skala die im Felde anfälligen Sorten bis in die Gruppe II herauf erstrecken (3). Damit war erwiesen, daß die Ergebnisse, welche KÖHLER an einem bestimmten Sortiment mit einer Rasse des Erregers gewonnen hatte, nicht verallgemeinert werden dürfen.

KÖHLER hat darauf verwiesen, daß es immer Sorten geben wird, die im Felde geprüft werden müssen (9). Auf der internationalen Krebskonferenz in Smolenice 1958 ist in mehreren Vorträgen gleichfalls die Feldprüfung als die zuverlässigere und damit entscheidende Prüfung herausgestellt worden (15). Allein die oben erwähnten Erfahrungen mit den Sorten Roode Star und Virginia zwingen zu anderen Schlüssen. Nach unseren Feldversuchen bildete die Sorte Fortuna, um weitere Beispiele zu nennen, an 3 von 50 Stauden im Jahre 1955 in einem Herd der Rasse 7 winzige Wucherungen, das geringe Wucherungsvermögen war im Laboratorium nachweisbar. Diese Sorte blieb im Felde in den Jahren 1957, 1958 und 1959 befallsfrei. Die Sorte Hassia wurde in den Jahren 1957 (als Zuchtstamm), 1958 und 1959 in einem Herde der Rasse 8 nicht befallen, zeigte jedoch in einem zweiten, eng benachbarten Herd derselben Rasse im Jahre 1958 ganz vereinzelt Wucherungen. In diesem Herd wurde Hassia 1959 nicht mehr befallen. Im Laboratorium wurde sie als Grenztyp erkannt. Diese Sorten sind ebenso wie „Virginia" und „Ambassadeur" nach ihrem Verhalten gegenüber einer bestimmten Rasse in die Gruppe II der Skala KÖHLERS einzuordnen. Eine Entscheidung über die Krebsfestigkeit gegenüber einer bestimmten Rasse mit einem zweijährigen Feldversuch, wie er in Holland üblich ist, kann nicht als ausreichend angesehen werden. Eine Beurteilung derartiger Sorten wäre nur nach langjährigem Anbau in Krebsherden, möglichst unter besonderen klimatischen Bedingungen, möglich. Die Züchtung benötigt aber nach den Vorauslesen auf Krebsfestigkeit in verhältnismäßig kurzer Zeit eine klare Entscheidung über einen Zuchtstamm.

Neben der Abhängigkeit von Außenbedingungen, insbesondere von Temperatur und Feuchtigkeit, haften außerdem den Feldprüfungen zahlreiche Unsicherheiten an: Ungleichmäßige Durchseuchung der Parzelle, leichtes Übersehen von vereinzelten Wucherungen, Verwechslungen mit ähnlichen Gallbildungen durch Befall mit *Spongospora subterranea* und, wenn kein ausreichender Fruchtwechsel wegen zu geringer Größe der Parzellen möglich ist, Gefahr des Durchwuchses und zunehmender Nematodenverseuchung.

Um zu vermeiden, daß Sorten zugelassen werden, die sich später als krebsanfällig erweisen, ist es notwendig, Zuchtstämme und Sorten mittlerer Resistenz schärfer zu beurteilen, als es früher üblich war. Oft ist eine anatomische Untersuchung infizierter, aber zweifelhafter Triebe nicht zu umgehen. Bei Symptomen der Gruppe II nach KÖHLER (Tab. 1) muß heute das Urteil „krebsanfällig" lauten. Die Entscheidung über die Krebsfestigkeit einer Sorte ist in Ländern mit obligatorischer Krebsresistenz der Kartoffelsorten,

wie in beiden Teilen Deutschlands, in Österreich und neuerdings in Holland, schwerwiegend. Bedenkt man jedoch, daß eindeutig resistentes Material in ausreichender Zahl angeboten wird und der Prozentsatz von Grenztypen recht niedrig ist, so dürfte es zu verantworten sein, einer Sorte mit nur mittlerer Resistenz und vorhandenem Wucherungsvermögen das Prädikat resistent nicht zu geben, selbst wenn diese im Felde niemals Wucherungen oder Dauersporen bilden würde. Ohne scharfe Beurteilung besteht immer die Gefahr (sic Virginia!), daß bei einer sogenannten „krebsfesten" Sorte doch Wucherungen auftreten und sofort eine neue Krebsrasse proklamiert wird.

Zusammenfassung

Beimpft man Kartoffelsorten mit *Synchytrium endobioticum*, so sind bei geringer Resistenz dichte, zerstreute und vereinzelte Infektionen zu beobachten. Bei Sorten mittlerer Resistenz bleiben Dichtinfektionen aus, während bei hochresistenten Sorten nur vereinzelte Infektionen auftreten. Unabhängig von dieser unterschiedlichen Befallsdichte ist das Reaktionsvermögen der Kartoffelsorten. So können Sorten geringer Resistenz auf Befall durch *S. endobioticum* mit einer starken Wucherungsbildung reagieren, das Wucherungsvermögen kann aber auch vermindert sein oder fehlen. Diesen drei Reaktionstypen entsprechen jeweils die Sorten Deodara, Roode Star und Urgenta. Auch Sorten mittlerer Resistenz können ein starkes Wucherungsvermögen aufweisen und somit trotz verringerter Befallsdichte im Felde gelegentlich Wucherungen bilden. Diesem Typ entspricht die Sorte Virginia. In all diesen Fällen muß mit der Bildung von Dauersporen des Erregers gerechnet werden. Daher sollten derartige „Grenztypen" wie „Roode Star", „Urgenta" und „Virginia" vom Anbau ausgeschlossen werden. Bei Sorten des Typs „Virginia" besteht außerdem noch die Gefahr, daß durch gelegentliches Auftreten von Wucherungen die Existenz einer neuen Rasse des Erregers vorgetäuscht wird.

Summary

Investigations on the estimations of the resistance of potato varieties to *Synchytrium endobioticum* (Schilb.)

When potato varieties are inoculated with *Synchytrium endobioticum*, dense, scattered and isolated infections occur if the resistance of the variety is low. In varieties of medium resistance no dense infections occur, and in highly resistant varieties only isolated infections are found. The capacity for reaction in potato varieties is independent of this differential density of infection. Thus varieties of low resistance can react to attack by *S. endobioticum* with an intense production of tumours, or the capacity for tumour formation can be reduced or absent. The varieties Deodara, Roode Star and Urgenta correspond to these three reaction types respectively. Varieties of

medium resistance can also display a strong capacity for tumour formation and can form tumours occasionally in the field in spite of their low density of infection. The variety Virginia corresponds to this type. In all these cases there is the danger of resting spores being formed. Hence the "borderline types" such as Roode Star, Urgenta and Virginia should be excluded from cultivation. With varieties of the Virginia type there is further danger that the occasional occurrence of tumours may give the impression of the existence of new races of the pathogen.

Literaturverzeichnis

1. Cartwright, K., 1926: On the nature of the resistance of the potato to wart disease. Ann. Bot. **40**, 391—395.
2. Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Basel.
3. Hey, A., 1951: Untersuchungen über die Anfälligkeit von Kartoffelsorten gegen den Krebsbiotypen G. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Berlin) N. F. **5**, 226 bis 231.
4. Hille, M., 1959: Ein einfaches Verfahren zur Infektion der Tomate mit *Synchytrium endobioticum* (Schild.) Perc. Phytopath. Z. **36**, 394—405.
5. Janežik, F., 1959: Der Kartoffelkrebs in Jugoslawien. Rostlinná výroba **5**, 91—96.
6. Karling, J. S., 1953: *Micromyces* and *Synchytrium*. Mycologia **45**, 276—287.
7. Köhler, E., 1928: Fortgeführte Untersuchungen über den Kartoffelkrebs II. Arb. Biol. Reichsanst. **15**, 135—176.
8. — —, 1928: Fortgeführte Untersuchungen über den Kartoffelkrebs III. Arb. Biol. Reichsanst. **15**, 401—416.
9. — —, 1931: Der Kartoffelkrebs und sein Erreger (*Synchytrium endobioticum* [Schilb.] Perc.). Landw. Jb. **74**, 729—806.
10. — —, 1932: Über das Verhalten von *Synchytrium endobioticum* auf anfälligen und widerstandsfähigen Kartoffelsorten. Arb. Biol. Reichsanst. **19**, 263—284.
11. — —, und J. Lemmerzahl, 1931: Über die Prüfung von Kartoffelsorten im Gewächshaus auf ihr Verhalten gegen den Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*). Arb. Biol. Reichsanst. **18**, 177—188.
12. Lemmerzahl, J., 1930: Beiträge zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses. Phytopath. Z. **2**, 257—320.
13. Ullrich, J., 1958: Die physiologische Spezialisierung von *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in der Bundesrepublik. Phytopath. Z. **31**, 273—278.
14. — —, 1959: Die Prüfungen von Kartoffelsorten und Kartoffelzuchtstämmen auf Resistenz gegenüber den Biotypen des Kartoffelkrebserregers (*Synchytrium endobioticum*). Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) **11**, 10—12.
15. — —, 1959: Die internationale Kartoffelkrebstagung in Smolenice, CSR, vom 4. bis 7. 11. 1958. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) **11**, 45—46.

Aus dem Institut für Phytopathologie und Pflanzenschutz
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. E. Reinmuth

Zur Anwendung des Wurzelhaarinfektionstestes bei *Plasmodiophora brassicae* Wor.

Von

H. Bochow

Mit 7 Abbildungen

Untersuchungen über die Frage der Umweltbeeinflussung von *Plasmodiophora brassicae* Wor., dem Erreger der Kohlhernie, sind von besonderer Bedeutung, da direkte Bekämpfungsmaßnahmen bisher nur in geringem Umfange Erfolg brachten. Für Arbeiten auf dem genannten Gebiete sind Verbesserungsmöglichkeiten der entsprechenden Untersuchungsmethoden wichtig.

Bisher fand der von Samuel und Garrett (1945) entwickelte Wurzelhaarinfektionstest bei Versuchen mit dem Hernieerreger breite Anwendung. Bereits von den Begründern dieser Testmethode wurde hervorgehoben, daß die Auswertung der Intensität von Primärinfektionen des Pilzes in den Wurzelhaaren bei Versuchen über eine Umweltbeeinflussung erhebliche Vorteile gegenüber der bislang üblichen Methode der Befallsbeurteilung an erwachsenen Wirtspflanzen oder der direkten Keimprüfung des Pilzes mit sich bringt. Es erweist sich die Verkürzung der Untersuchungszeit im Infektionstest gegenüber den länger andauernden Befallsversuchen bei der außerordentlich starken Variabilität von Bodeneinflüssen als besonders günstig. Hinzu kommt der Vorteil, auch kleinere, besser kontrollierbare Bodenmengen verwenden zu können und die Möglichkeit exakter mathematischer Auswertung der ausgezählten Infektionsstellen. Gegenüber einer einfachen Keimprüfung des obligat parasitären Herniepilzes besitzt die Anwendung des Infektionstestes den Vorteil der Ausnutzung einer gewissen Keimstimulanz durch die Würzelchen der Testpflänzchen. Es ist jedoch zu beachten, daß bei Infektionsunterschieden nicht immer allein die Reaktion des Krankheitserregers sondern nicht selten auch die der Wirtspflanze beteiligt sein kann.

Für die Beobachtung der Primärinfektionen von *Plasmodiophora brassicae* in den Wurzelhaaren empfehlen Samuel und Garrett (1945) sowie in Weiterführung dieser Versuche auch Macfarlane (1952) folgende Methodik:

Je nach dem Ziel der Untersuchungen wird ein Versuchsboden hergerichtet, der zweckmäßigerweise aus einer Mischung von Erde und Quarzsand (im Mittel etwa 1 : 3) besteht. Die Erde-Quarzsand-Mischung muß so beschaffen sein, daß sowohl eine zu starke Krümelung als auch ein Verschlämmen des Mediums vermieden wird, da sonst die weitere Durchführung des Testes behindert wird.

Das Erde-Quarzsand-Gemisch wird gedüngt oder ungedüngt bis 80 % seiner Wasserkapazität mit destilliertem Wasser angefeuchtet. Dieser Feuchtigkeitsgehalt gilt für *Plasmodiophora* als optimal. Einbezogen in die Wassermenge ist die Zugabe einer mit Hilfe der Zählkammer gemessenen Suspension von Dauersporen des Herniepilzes. Das befeuchtete Erde-Quarzsand-Gemisch wird anschließend intensiv gemengt und in 300 cm^3 fassende Versuchsgefäße gefüllt.

Am darauffolgenden Tage wird die Mischung mit vorgekeimten Kruziferensamen besät und eine Woche lang im unbelichteten Brutschrank bei 25 °C aufgestellt. Nach Ablauf dieser Zeit werden die gewachsenen Würzelchen der Keimpflanzen ausgespült und in 1%ige Karminessigsäure gelegt. Kurze Zeit später erkennt man in den Wurzelhaaren die sich rot anfärbenden Sporangienhäufchen, die je nach dem Grade der Infektion in verschieden hohem Maße zu finden sind. Jedes Sporangienhäufchen soll nach Ayers (1944) der Infektion eines Dauersporenschwärmers entsprechen. Durch Auszählen der gefärbten Sporangienhäufchen an einer bestimmten Wurzelstrecke, die völlig vom Versuchsboden umgeben war, erhält man einen quantitativen Überblick über den Vorgang der Infektion.

Nach neueren Versuchen von Macfarlane (1958) gelang es, diesen Wurzelhaarinfektionstest auch in Nährlösungskulturen durchzuführen. Ebenso wie bei den Erde-Quarzsand-Mischungen erweist es sich auch bei einer Flüssigkeitskultur als notwendig, der jeweiligen Zusammensetzung und vornehmlich der Konzentration der Nährlösung besondere Beachtung zu schenken.

Vierjährige Arbeiten mit dem Wurzelhaarinfektionstest in verschiedenen Erde-Quarzsand-Mischungen im Rahmen von Untersuchungen über den Einfluß bestimmter Bodenfaktoren auf den Hernieerreger veranlassen uns zu einigen methodischen Bemerkungen.

Unsere Versuche wurden im allgemeinen mit *Sinapis alba* (Sorte Maleksberger Gelb) als Testpflanze in Neubauerschalen oder 100-cm^3-Bechergläsern durchgeführt, wobei als Versuchsboden entweder reiner Hohenbockaer Quarzsand oder verschiedene Mischungen zwischen gesiebtem Boden und Quarzsand dienten.

Die Sporensuspension zur Verseuchung bestand aus einer durch Filtrieren und fraktioniertes Zentrifugieren gereinigten Wasseraufschwemmung mazerierter Herniewucherungen von einer Wirtspflanzenspezies (z. B. von Kohlrübe, Raps o. ä.). Die Reinigung mit Wasser in der Zentrifuge erwies sich stets als außerordentlich wichtig, da nicht selten gefunden wurde, daß durch Rückstände von Wirtspflanzeninhaltsstoffen (vermutlich Senfölen o. ä.) die Infektiosität der Sporen beträchtlich vermindert wurde. Der Grad der Verseuchung wurde wegen der Vergleichbarkeit durch Auszählen der Dauersporen je cm^3 Bodentrockensubstanz berechnet. Es erwies sich als günstig, die Verseuchung je cm^3 auf etwa 10^6 bis 10^7 Sporen zu bemessen. Eine zu starke Verseuchung hat den Nachteil, daß die Beeinflußbarkeit der Sporenmasse abnimmt. So ist in stark verseuchten Versuchsböden im allgemeinen ein Bodeneinfluß geringer wahrzunehmen als in schwächer verseuchten Parallelen. Eine zu geringe Verseuchung andererseits brachte nicht selten Fehlschläge durch Mangel an auswertbarem, infiziertem Wurzelmaterial. Die Aufbewahrung der Sporensuspension von Versuch zu Versuch erfolgte im Kälteschrank bei

Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt. Wie Versuche ergaben, war die Beeinflussung der Infektion durch Dauersporen, die unmittelbar gewonnen wurden, wesentlich anders als die durch Sporen, welche längere Zeit lagerten. Da sich dieser Unterschied offenbar nur zwischen wenige Tage gelagerten Sporen und längere Zeit, d. h. 1 oder 8 Monate aufbewahrten Sporen zeigte, nicht aber z. B. zwischen 1 oder 8 Monate lagerndem Material, wurde darauf geachtet, daß grundsätzlich mindestens 14 Tage lang abgelagerte Sporensuspensionen als Impfmaterial Verwendung fanden. Die Sporensuspensionen hielten sich im allgemeinen ein Jahr voll infektiös.

Je Neubauerschale wurden 13, je Becherglas 7 oder 10 Senfkörner in 0,5 cm Tiefe ausgelegt.

Die Dauer eines Infektionstestes sowie die Zahl der Wiederholungen bzw. auszuwertender Einzelpflanzen je Versuchsglied erwies sich in besonderem Maße als entscheidend für das Versuchsergebnis. Entsprechende Beobachtungen werden im nachfolgenden mitgeteilt.

Die Auswaschung auszuwertender Pflänzchen bei Versuchsende erfolgte unter scharfem Wasserstrahl über Siebtrichter.

Wahllos den Versuchsgefäßen entnommene Pflänzchen wurden unter Abtrennung des oberirdisch gewachsenen Teiles in 0,75- bis 1,0%iger Karminessigsäure aufbewahrt.

Die mikroskopische Auszählung der Wurzelhaarinfektionen (Abb. 1) wurde 4 bis 5 Tage nach dem Einlegen der Würzelchen in die Färbelösung begonnen. Ein Aufbewahren von länger als einem Monat erschwerte die Auszählungen durch zu intensive Mitfärbung plasmatischer Pflanzenteile. Jedes für sich in den Seitenhaaren der Hauptwurzeln identifizierbare Sporangienhäufchen (Abb. 2) wurde als e i n e Infektion gezählt. Ein Zusammenfließen der von eingedrungenen Zoosporen herrührenden Plasmodien ist in den Wurzelhaaren nur dann zu erwarten, wenn die entsprechenden Infektionsstellen außerordentlich eng beieinander liegen. Es ist nicht bekannt, daß die Plasmodien sich teilen und somit von einer Infektion zwei Sporangienhäufchen herrühren (AYERS 1944). Es wurden deshalb in einem Wurzelhaar auch mehrere Infektionen berücksichtigt, sofern es möglich war, zu entscheiden, daß die Sporangienhäufchen voneinander getrennt waren (Abb. 3 und 4). Mitunter sichtbare, angefärbte plasmatische Konglomerate auf den Wurzelhaaren (Abb. 5), die zwar mit großer Wahr-

Abb. 1. Durch *Plasmodiophora brassicae* infizierte Wurzelhaare von *Sinapis alba*. Die dunklen Stellen sind die mit Karminessigsäure angefärbten Sporangienhäufchen.
Vergrößerung: Negativ 50fach, Neg./Pos. 1 : 3,5

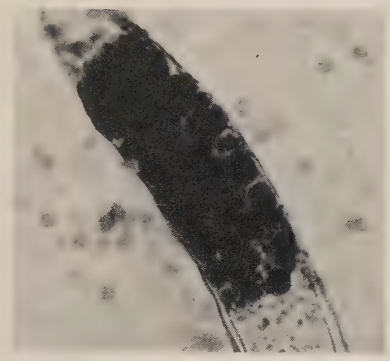


Abb. 2. Ein karmingefärbtes Sporangienhäufchen in einem Wurzelhaar. Entspricht einer Infektion, da die Entwicklung aller Sporangien von einer eingedrungenen Zoospore (aus einer Dauerspore) ausgeht (AYERS 1944). Vergrößerung: Negativ 252fach, Neg./Pos. 1 : 3

Abb. 3. Zwei karmingefärbte Sporangienhäufchen in einem Wurzelhaar von *Sinapis alba*. Als 2 Infektionen bewertet. Erklärung siehe Text. Vergrößerung: Negativ 252fach, Neg./Pos. 1 : 3

scheinlichkeit in Zusammenhang mit dem Infektionsvorgang von *Plasmodiophora brassicae* stehen (Anhäufung eindringender Myxamöben des Pilzes?), wurden nicht als Infektionen bewertet. Als Kriterium galt stets die sichere Erkennbarkeit des Beginns oder Vorhandenseins sporenförmiger Abgrenzungen innerhalb der Plasmodien in einem sonst leer erscheinenden Wurzelhaare.

Nebenwurzeln sowie Wurzelhaare, die sich auf der Hauptwurzel oder darunter beim Quetschpräparat der Sicht entzogen, wurden bei der Zählung vernachlässigt. Jede Infektionszahl stellt somit nur eine R e l a t i v z a h l dar.

Die zur Auswertung notwendige Wurzellänge wurde durch Versuche entschieden. SAMUEL und GARRETT (1945) sowie MACFARLANE (1952) geben an, daß an 2 Zentimetern der Wurzel — möglichst vom oberen zweiten und dritten Zentimeter — die Infektionen auszuzählen sind. Diese Arbeit beansprucht einen erheblichen Aufwand. Es wurde deshalb nachgeprüft, inwieweit Unterschiede bestehen in der Auswertung nur eines Zentimeters der Wurzel gegenüber zweien bei ein und derselben Pflanze.

Eine Untersuchung der Infektionszahlen von Senfwürzelchen in drei gleichmäßig mit $1{,}64 \cdot 10^6$ Sporen je cm^3 verseuchten Erde-Quarzsand-Ge-

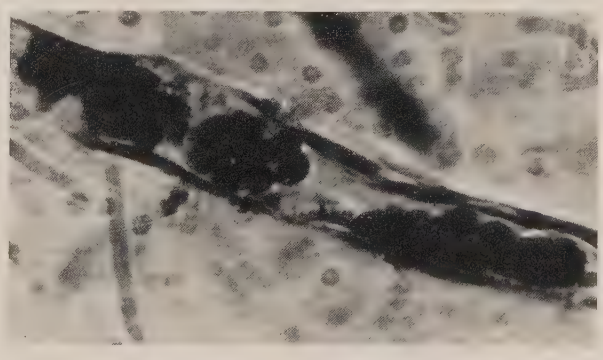


Abb. 4. Drei karmingefärbte Sporangienhäufchen in einem Wurzelhaar. Als 3 Infektionen bewertet. Erklärung s. Text. Vergrößerung: Negativ 252fach, Neg./Pos. 1 : 3,6

mischen ergab nach fünftägiger Versuchsdauer, daß, relativ gesehen, Identität zwischen der großen und kleinen ausgewerteten Wurzelstrecke besteht. Die Korrelationskoeffizienten bei Vergleichen zwischen 1 und 2 cm ausgezählter Wurzelstrecke betrugen in den Erde-Quarzsand-Gemischen

1 = 18 untersuchte Paare	r = + 0,903,
2 = 19 untersuchte Paare	r = + 0,913,
3 = 11 untersuchte Paare	r = + 0,983.

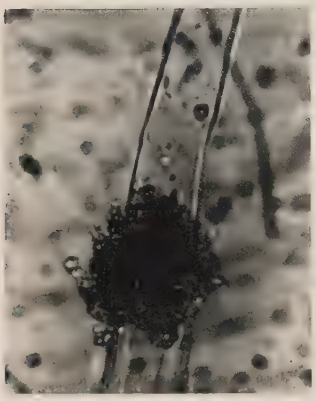


Abb. 5. Mitunter zu findende plasmatische Konglomerate auf den Wurzelhaaren, die nicht als Infektionen gewertet wurden. Erklärung im Text. Vergrößerung: Negativ 252fach, Neg./Pos. 1 : 3

Für sämtliche Versuche wurde demzufolge die Auszählung von nur einem Zentimeter der Wurzel, nämlich des zweiten vom Wurzelhals gerechnet, als genügend angesehen. Nur in besonderen Fällen, bei völligem Fehlen der Infektionen oder sehr geringen Zahlen, wurden größere Wurzellängen untersucht.

Die erforderliche Dauer der Infektionsversuche wurde von den Autoren der Methode mit einer Woche angegeben (SAMUEL und GARRETT 1945). Eigene Versuche (Tab. 1, Abb. 6) bestätigten dies im wesentlichen.

Es ließ sich zeigen, daß schon nach 4 bis 5 Tagen beträchtliche Infektionshöhen erzielt wurden, die bei der Relativauswertung bereits genügen dürften, um in besonderen Fällen (Gefährdung der wachsenden Testpflänzchen durch Umfallkrankheitserreger o. ä.) auch schon früher als nach 7 Tagen einen Versuch abzubrechen. Diese Frühauswertung gelingt jedoch nur, wenn vollinfektiöses und gut keimfähiges Sporenmaterial verwendet wird.

Als eine sehr wichtige Frage erwies sich die nach der notwendigen Zahl der auszuwertenden Wiederholungen und Einzelpflanzen bei Durchführung eines Testes. In den bisherigen Arbeiten mit der Infektionsmethode wurde von anderen Autoren ein Mittelwert aus 20 ausgezählten Wurzeln — stammend aus 4 Wiederholungen mit je 5 Pflanzen — als ausreichend betrachtet (SAMUEL und GARRETT 1945, MACFARLANE 1952). Der hierzu erforderliche Arbeitsaufwand trat als begrenzender Faktor für eine möglichst breite Durchführung von Wiederholungsversuchen auf. Es mußte entschieden werden, ob zumindest für Wiederholungsversuche mit einer geringeren Anzahl von auszuwertenden Pflanzen gearbeitet werden konnte. Mit Hilfe eines von BOCHOW, HÖHNE und RAEUBER (1958) entwickelten Diagramms war es möglich, bei Wiederholungsversuchen ohne Veränderung der

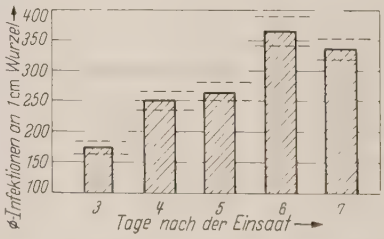


Abb. 6. Veränderung der Infektionshöhe bei verschieden langer Versuchsdauer (Tabelle 1). = Streuung

Tabelle 1

Die Abhängigkeit der erzielten Infektionen von der Dauer der Versuchszeit

Zur Prüfung wurde ein Sandboden-Quarzsand-Gemisch einheitlich mit 2,43 × 10^6 Sporen je cm^3 verseucht und in verschiedenen Tagen untersucht. Je Tag wurden vier Wiederholungen mit je fünf Pflanzen ausgezählt.

Versuchsende in Tagen nach der Einsaat	Mittlere Zahl der Infektionen an 1 cm Wurzel $\bar{x}$	s
3	176,8	10,18
4	252,3	14,53
5	268,1	14,37
6	369,4	25,28
7	338,4	17,67

Aussagekraft eines Testes die Anzahl auszuwertender Pflanzen von 20 auf etwa 15 zu reduzieren. Für die Reproduktion von Ergebnissen genügte mithin eine Versuchsanstellung mit drei Wiederholungen bei Auszählung von je 5 Einzelpflanzen.

Für die Auswertung unterschiedlicher Infektionsergebnisse ist es wichtig zu wissen, ob die Unterschiede in den gewonnenen Infektionszahlen bei Versuchswiederholungen nach gleicher Methodik auch wieder in etwa gleicher absoluter Höhe auftreten, oder ob nur eine tendenzmäßige ± Differenz zu reproduzieren ist. Zur Lösung dieser Frage setzten wir kurz nacheinander drei Versuche mit je zwei verschiedenen Erde-Quarzsand-Mischungen an (a und b), deren unterschiedliche Infektionsbeeinflussung geprüft werden sollte. Es handelte sich dabei um sonst völlig gleiche Versuche, die nur zu verschiedenen Zeiten angesetzt wurden. Die Verseuchung betrug jeweils 3,38 · 10^5 Herniesporen je cm^3. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Versuchswiederholung mit gleichem Material

Versuch	∅ Infektionen an 1 cm Wurzel im Erde-Quarzsand-Gemisch		relativ	
	a $\bar{x}$	b $\bar{x}$	a	b
1	78,5	6,3	100	8
2	9,6	0,0	100	0
3	244,0	4,9	100	2

Es wird aus diesem Beispiel deutlich, daß jeder Versuch zwar immer eine geringere Zahl von Infektionen im Erde-Quarzsand-Gemisch b gegenüber dem Vergleichspartner a bringt, daß aber eine Beständigkeit des Verhältnisses beider Infektionszahlen zueinander und zum anderen trotz gleicher Verseuchung eine konstant bleibende absolute Infektionshöhe nicht zu erkennen ist. Diese Tatsache spiegelt sich in allen unseren bisherigen Versuchswiederholungen wider, wobei es gleichbleibt, welche Art von einflußnehmenden Faktoren

— ob rein chemischer oder biologischer Natur — im Infektionstest geprüft wurden. Es ist also hervorzuheben, daß Ergebnisse von Versuch zu Versuch nur t e n d e n z m ä ß i g vergleichbar sind. Sofern ein gradueller Unterschied ermittelt werden soll, ist gezwungenermaßen die Frage in einem Versuch zu lösen.

Die beobachtete relativ hohe Variabilität der Infektionsergebnisse dürfte nach unseren Erfahrungen im wesentlichen von der wechselnden Neigung des verwendeten Sporenmaterials zum Keimen herrühren. So zeigt sich nicht nur häufig — bei sonst gleichen Verhältnissen — eine unterschiedliche Infektionshöhe von Versuch zu Versuch, sondern es kann gelegentlich sogar vorkommen, daß Infektionsversuche fehlschlagen, weil kein Eindringen des Pilzes in die Wurzelhaare zu beobachten ist. Derartige Phänomene wurden anfangs einer Unbrauchbarkeit des Impfmaterials zur Last gelegt. Täglich angesetzte Versuchsreihen, bei denen immer wieder gleiches Material zur Verwendung kam und die sich über 2 Monate erstreckten, ließen jedoch deutlich werden, daß Alter oder Herkunft des Impfmaterials nur in geringem Maße von Bedeutung waren. Es konnte zwar durch Vergrößerung der Verseuchungsmenge und durch Verlängerung der Versuchsdauer (bis zu 8 Tagen) eine Verminderung der Zahl auftretender Fehlschläge durch Nichtinfektion erreicht werden; trotz optimaler Gestaltung aller sonst wirkenden Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert, Bodenart, Nährstoffversorgung, Wirtspflanzenspezies) ließen sie sich aber nicht völlig unterbinden. Die Variabilität des erzielbaren Infektionserfolges bei ein und demselben Sporenmaterial konnte also nur von noch unbekannten und nicht regulierbaren Faktoren abhängen, die sich zwar als Unsicherheitsfaktoren mit einberechnen, nicht aber fernhalten ließen.

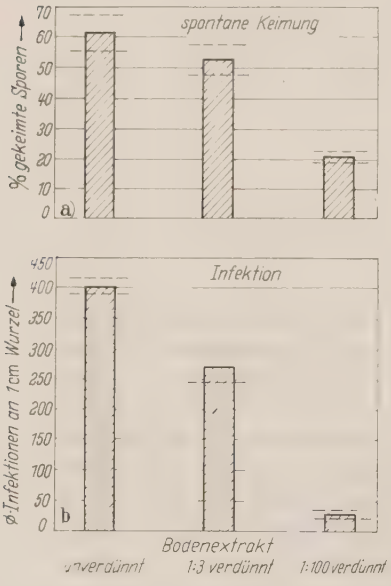


Abb. 7. Gegenüberstellung der an Senfwurzeln erzielten Infektionen (b) und der spontanen Keimung (a) von *Plasmodiophora brassicae* in vergleichbaren Medien (= Hohenbockaer Quarzsand mit Bodenextrakt)

Für die Auswertung von Ergebnissen des Wurzelhaarinfektionstestes wird neben den erwähnten methodischen Gesichtspunkten noch eine bereits angedeutete grundsätzliche Frage aufgeworfen:

Wie sind die Unterschiede in der Infektionshöhe des Pilzes *Plasmodiophora brassicae* in den Wurzelhaaren der Wirtspflanze zu deuten? Kommt hierbei im wesentlichen eine verschiedene Reaktion allein des Pilzes zum Ausdruck, oder spielt auch ein Wechsel der Wirtsanfälligkeit bei den Sämlingen eine Rolle?

Betrachtet man die mit der Wurzelhaarinfektionsmethode erzielten Untersuchungsbefunde von MACFARLANE (1952) und vergleicht sie mit den bisherigen

Beobachtungen bei Befallsuntersuchungen und auch Keimversuchen des Hernieerregers (Bremer 1923), so muß weitgehend damit gerechnet werden, daß im vorliegenden Test eine Beeinflussung von *Plasmodiophora* und weniger eine Beeinflussung der Wirtspflanze angezeigt wird.

Eine Reihe eigener Versuche bestätigte diese Anschauung. Es wurden Teste angesetzt, die in einigen Parallelen nicht mit einer Testpflanze besät wurden. Diese Parallelen wurden gegenüber den normal besäten Versuchsgliedern nicht nach wenigen Tagen, sondern erst nach mindestens 2 bis 4 Wochen ausgewertet. Die Auswertung geschah dabei in der Form, daß die Herniesporen aus dem Quarzsandgemisch durch Aufschwemmung und Absetzenlassen der Bodenteilchen wieder zurückgewonnen wurden und auf ihr Aussehen hin untersucht wurden. Deutlich leere, gut erhaltene Sporenhüllen wurden als gekeimte Sporen bewertet, während die offensichtlich vollen, gut aussehenden und stark lichtbrechenden normalen Sporen als ungekeimt galten. Alle zweifelhaften Fälle (beschädigte Sporen, zerquetschte Hüllen usw.) wurden außer acht gelassen. Die auf diese Weise erhaltenen Keimprozente der Sporen wurden den mit dem gleichen Medium, aber unter Beisein der Wirtspflanze erzielten Infektionszahlen gegenübergestellt. Wie Abbildung 7 und Tabelle 3 darstellen, ließ sich in der Mehrzahl der Fälle zwischen beiden Auswertungsarten eine gute Korrelation finden.

Tabelle 3

Vergleich des Einflusses eines Bodenextraktes auf die spontane Keimung und auf die Infektion von *Plasmodiophora brassicae*

Infektionsversuch: 3 Versuchswiederholungen, 4 bis 5 Pflanzen je Wiederholung ausgewertet, Verseuchung 4,1 × 10^7 Sporen je cm^3, pH-Wert der Versuchsparallelen einheitlich zwischen 6,9 und 7,1; Versuchsdauer 6 Tage.

Versuchsvariante	Mittlere Zahl der Infektionen an 1 cm Wurzel	
	$\bar{x}$	s
Quarzsand + Bodenextrakt unverdünnt	403,2	13,38
Quarzsand + Bodenextrakt 1 : 3 verdünnt	270,8	22,50
Quarzsand + Bodenextrakt 1 : 100 verdünnt	27,2	4,24

Keimversuch: Ohne Pflanzen, Versuchsdauer 68 Tage, sonst wie Infektionsversuch. Ausgezählte Sporen je Versuchsvariante: 400.

Versuchsvariante	%-Satz gekeimter Sporen	
	$\bar{x}$	s
Quarzsand + Bodenextrakt unverdünnt	61,5	5,73
Quarzsand + Bodenextrakt 1 : 3 verdünnt	53,0	5,21
Quarzsand + Bodenextrakt 1 : 100 verdünnt	21,5	1,94

Die Infektionsunterschiede bei Auszählung der Primärinfektionen von *Plasmodiophora brassicae* wurden demnach im wesentlichen als Folgen einer Beeinflussung der K e i m u n g des Pilzes gedeutet.

Es darf abschließend hervorgehoben werden, daß der Wurzelhaarinfektionstest trotz aller methodischen Schwierigkeiten, die insbesondere in der verstärkt zum Ausdruck kommenden Variabilität der Keimung des Pilzes liegen, eine empfehlenswerte und bei Beachtung der dargestellten Einzelheiten auch gut brauchbare Untersuchungsmethode bei Reihenversuchen mit dem Herniepilz darstellt.

Zusammenfassung

1. Es werden methodische Fragen für die Durchführung und Auswertung von Wurzelhaarinfektionstesten bei ökologischen Untersuchungen mit *Plasmodiophora brassicae* Wor. behandelt.

2. Die Zahl der Primärinfektionen des Herniepilzes in den Wurzelhaaren von Wirtspflanzen unterliegt trotz Konstanthaltens der Versuchsbedingungen einer hohen Variabilität. Infektionsergebnisse lassen sich demzufolge nur relativ auswerten.

3. Numerische Unterschiede bei Wurzelhaarinfektionen werden im wesentlichen als Folge einer unterschiedlichen Keimung des Pilzes angesehen.

Summary

The application of the root hair infection test for *Plasmodiophora brassicae* Wor.

1. Questions concerning the technique of carrying out and evaluating root hair infection tests in ecological investigations with *Plasmodiophora brassicae* Wor. are discussed.

2. The number of primary infections of the club root fungus in the root hairs of the host plant is subject to a high degree of variation, even when the experimental conditions are kept constant. Results of infection can therefore be evaluated only relatively.

3. Numerical differences in root hair infections are regarded mainly as the result of differences in germination of the fungus.

Literaturverzeichnis

Ayers, G. W., 1944: Studies on the life history of the club root organism *Plasmodiophora brassicae*. Canad. J. Res., Sec. C, **22**, 143—149.

Bochow, H., W. Höhne und A. Raeuber, 1958: Über die Bestimmung der für einen repräsentativen Mittelwert notwendigen Anzahl von Einzelwerten. Z. Angew. Meteorol. **3**, 171—173.

Bremer, H., 1923: Untersuchungen über Biologie und Bekämpfung des Erregers der Kohlhernie, *Plasmodiophora brassicae* Woronin. 2. Mitt. Kohlhernie und Bodenazidität. Landw. Jb. **59**, 673—685.

Macfarlane, I., 1952: Factors affecting the survival of *Plasmodiophora brassicae* Wor. in the soil and its assessment by a host test. Ann. appl. Biol. **39**, 239—256.

— —, 1958: A solution - culture technique for obtaining root hair or primary infection by *Plasmodiophora brassicae*. J. gen. Microbiol. **18**, 720—732.

Samuel, G., and S. D. Garrett, 1945: The infected root hair count for estimating the activity of *Plasmodiophora brassicae* Woron. in the soil. Ann. appl. Biol. **32**, 96—101.

Aus dem Phytopathologischen Institut der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

Stemphylium botryosum Wallr. als Erreger einer Lagerfäule am Apfel in Deutschland

Von

L. Behr

Mit 4 Abbildungen

Inhalt: 1. Schadbild und Erreger. — 2. Isolation des Erregers. — 3. Infektionsversuche. — 4. Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

1. Schadbild und Erreger

Äpfel der Sorte „Golden Delicious", welche einem Lagerungsversuch entstammten, faulten und wurden uns (Juli 1958) zur Identifizierung des Fäuleerregers überbracht. Die Fruchtschale wies runde, braune, nicht eingesunkene Flecke auf, die Fäule setzte sich mehrere Millimeter tief ins Fruchtfleisch fort. In der Feuchtkammer wuchs aus den Flecken bei 24 °C neben *Penicillium* spec. ein „schwarzer" Pilz heraus, der als *Stemphylium botryosum* Wallr. (Perfektform: *Pleospora herbarum* [Pers.] Rabh.) bestimmt wurde (Neergaard 1945).

Konidien 19,4 × 14,6 μ (Extremwerte 14,4 × 10,8 bis 28,8 × 20,4 μ), zumeist oval, durch mehrere Querwände deutlich eingeschnürt, mit mehreren schräggestellten Längswänden; dunkelolivbraun; Außenwand stachelig. Konidienträger terminal verdickt, Basis der Anschwellung dunkelbraun (Abb. 1).

2. Isolation des Erregers

Der Pilz wurde isoliert und auf Melasse-, Bierwürze- und Kartoffeldextroseagar-Schrägröhrchen (pH 6,5) fortgezüchtet. Er fruktifizierte nur auf Melasseagar, stellte aber die Sporenbildung nach einigen Passagen mehr und mehr ein. Auf Hefeaustausch- und Glukosepeptonagar (pH 7,5) entwickelte er ein üppiges, steriles Myzel und bildete nach 10- bis 14tägiger Bebrütung Perithezien. Sie reiften niemals, Asci konnten daher nicht beobachtet werden. Carter (1934 a) berichtet, daß eine von Äpfeln isolierte *P. herbarum* auf Hafermehlagar Perithezien bildete, daß es aber auch Stämme gäbe, die keine Ascosporen, sondern nur „black bodies" entwickeln würden, die unreifen Perithezien ähnelten.

3. Infektionsversuche

Stemphylium botryosum wurde (September 1958) auf Apfelfrüchte, deren Sortenzugehörigkeit in diesem nur orientierenden Versuch unbekannt war, verimpft.

Die Desinfektion der Früchte erfolgte 10 Min. in 0,1 % Sublimat. Nach zweimaligem Spülen in sterilem Aqua dest. wurden unter aseptischen Bedingungen Segmente abgeschnitten und zu je 4 Stück in großen, sterilen Doppelschalen (sogenannte Drygalskischalen, ⌀ = 20 cm, h = 5 cm) auf darin umgestülpte Petrischalendeckel gelegt. Steriles Aqua dest. auf dem Boden der Drygalskischale sorgte während der Dauer des Versuches für eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre (H.-J. MÜLLER 1959, unveröffentlicht)[1]).

Myzelflöckchen von *Stemphylium botryosum* wurden in sterile Stichwunden des Apfels übertragen und die Versuchsschalen im Dunkeln bei 24 °C aufgestellt. Drei Segmente je Schale wurden infiziert, ein viertes nur verletzt und nicht infiziert (Kontrolle).

Abb. 1. Konidien von *Stemphylium botryosum* Wallr. 550fach

Eine der drei Apfelsorten reagierte mit den oben geschilderten, für *Stemphylium botryosum* typischen Krankheitssymptomen: 6 Tage p. i. betrug der Durchmesser der Faulflecke 15 bis 18 mm. Am 17. Tage hatten diese mit einem Durchmesser von etwa 30 mm fast die ganzen Fruchtsegmente erfaßt (Abbildung 2), in deren gebräuntem Inneren das selten interzelluläre, zumeist intrazelluläre Myzel mikroskopisch leicht nachzuweisen war (Abb. 3). Die Kontrollen blieben gesund.

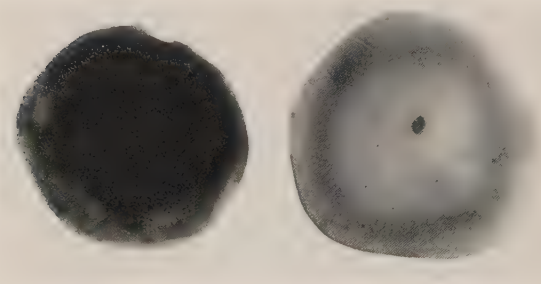


Abb. 2. Äpfel unbekannter Sortenzugehörigkeit, 17 Tage p. i. mit *Stemphylium botryosum* Wallr. (rechts: Kontrolle). Phot. MOHR. Verkleinert

Faules Fruchtfleisch wurde auf Melasseagar-Röhrchen übertragen und der sich entwickelnde Pilz erneut auf Apfelfrüchte verimpft. Er rief hier die charakteristischen Fäulesymptome hervor. Damit war der einwandfreie Be-

[1]) Diplomarbeit math.-naturwiss. Fakultät Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 1959.

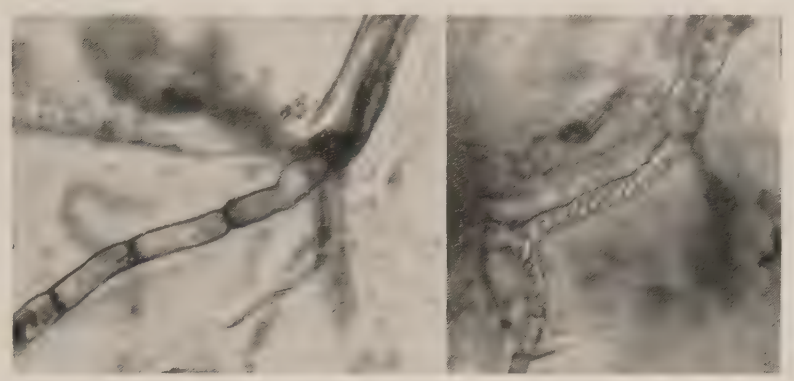


Abb. 3. Hyphen von *Stemphylium botryosum* Wallr. im Fruchtfleisch eines künstlich infizierten Apfels. 550fach

weis, daß *Stemphylium botryosum* der Erreger der Lagerfäule gewesen ist, erbracht. Der Pilz wuchs aus den bei 24 C gehaltenen, faulenden Fruchtsegmenten deutlich heraus, bildete aber keine Konidien. Ein Aufenthalt bei 5 C hemmte das Fortschreiten der Fäule nicht; da jetzt Konidien entstanden, hatte es den Anschein, als werde die Fruktifikation durch derartig tiefe Temperaturen gefördert.

Da, wie eingangs erwähnt, die Sorte „Golden Delicious" auf dem Lager an *S. botryosum* erkranken kann, sie aber in den eigenen Versuchen zunächst immer gesund blieb, mußte mit einer mit zunehmender Reife bzw. Lagerdauer allmählich steigenden Anfälligkeit der Sorten gerechnet werden. Um diese Frage zu klären, wurden an fünf Apfelsorten zu verschiedenen Zeiten Infektionsversuche angestellt[1]). Sie führten zu Ergebnissen, die Tabelle 1 zu entnehmen sind (vgl. auch Abb. 4).

Eine Abhängigkeit des Befalls vom jeweiligen Reifegrad der Apfelsorte liegt vor. Das wird besonders an den beiden Sorten „Gelber Edel" und „Roter Berlepsch" deutlich, die schon sehr zeitig und nur bis Ende Januar genußreif sind. „Gelber Edel" erkrankt bereits, wenn er im Oktober

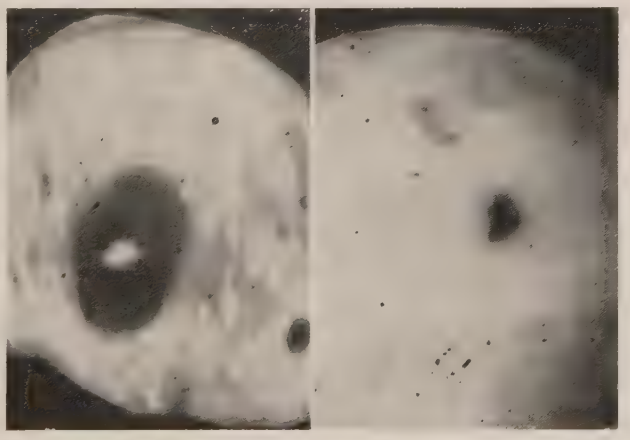


Abb. 4. Teile eines Apfels der Sorte „Brettacher", 7 Tage p. i. mit *Stemphylium botryosum* Wallr. (rechts: Kontrolle). Phot. Mohr. 1,2fach

[1]) Für die Bereitstellung der Äpfel danke ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. G. Friedrich und Herrn Dipl.-Ldw. M. Reichel, Institut für Obst- und Gemüsebau der Martin-Luther-Universität.

Tabelle 1

Reaktion von 5 Apfelsorten
auf die Infektion mit *Stemphylium botryosum* Wallr.

Sorte	Reifezeit (= Dauer der Genußreife)	Infektionsdatum	Befall	
			Tage p. i.	Faulfleck in mm ⌀
Gelber Edel	November—Januar	September 1958		—
		Oktober 1958	18	2
		Oktober 1958	36	6
		Oktober 1958	51	13 10 mm tief im Fruchtfleisch
Golden Delicious	Dezember—Februar	November 1958		—
		März 1959	10	6,5
		April 1959	8	14,7
		April 1959	11	28
Ontario	Dezember—Mai	März 1959		—
		April 1959	8	11
		April 1959	18	15
Roter Berlepsch	Dezember—Januar	März 1959	16	23
		April 1959	8	20
		April 1959	18	30
Brettacher	Dezember—Mai	März 1959		—
		April 1959	8	19
		April 1959	18	alle Fruchtsegmente total gefault
Kontrollen	—	—		gesund

des Pflückjahres, „Roter Berlepsch", wenn er im März des folgenden Jahres infiziert wird. Alle anderen, bis Februar oder Mai genußreifen Sorten ließen sich, mit Ausnahme des „Golden Delicious", erst ab April mit Erfolg infizieren. Eine sortenbedingte Anfälligkeit bzw. Resistenz konnte, nach eigenen Beobachtungen, nicht festgestellt werden. In diesem Zusammenhang sei aber erwähnt, daß der Erfolg einer künstlichen Infektion auch sehr stark vom Alter der Kultur des Erregers abhängig ist. Die höchsten Befallszahlen wurden mit einer 6 Tage alten, geringere mit einer 12 und ein sehr schlechtes Infektionsergebnis mit einer 28 Tage alten *Stemphylium*-Kultur erzielt.

4. Diskussion

Stemphylium botryosum Wallr. (= *Pleospora herbarum* [Pers.] Rabh.) ist seit einigen Jahrzehnten als Fäuleerreger an fleischigen Früchten und von vielen Wirtspflanzen als Ursache des „damping-off" sowie als Blatt- und Stengelfleckenerreger bekannt. Entsprechende Mitteilungen stammen vorwiegend aus Amerika, England, Holland und Italien (Anonym 1936, ENGLISH und GERHARD 1942: *Stemphylium* spec. auf Birnen bzw. Süßkirschen; NEERGAARD 1945). In Schweden isolierte BJÖRLING (1945 a und b) von faulen

Äpfeln *S. congestum* Newton (desgl. Heald 1930, Ruehle 1930 und English 1944 in Amerika), das jedoch, nach taxonomischen Überlegungen, mit *S. ilicis* Tengwall synonym, also ein *Pseudostemphylium* ist (Neergaard 1945). Als Erreger einer Lagerfäule an Äpfeln wurde *S. botryosum* erstmalig, und zwar unter der Bezeichnung *Pleospora pomorum* auct?, von Horne und Horne (1920) erwähnt, sodann von Rose und Butler (1927), die ihn von importierten Zitronen und Äpfeln isolierten. In Deutschland ist eine durch *S. botryosum* verursachte Fäule an lagerndem Obst noch nicht beobachtet worden. Horne und Horne (1920) und Horne (1925) stellten fest, daß die Infektion der Äpfel mit *S. botryosum* schon im August, solange nämlich die Früchte noch am Baume hängen, erfolgen kann, es aber erst im Obstkeller zur Fäule kommt. Carter (1934 a) bestätigt diesen Befund; es gelang ihm, die *Stemphylium*-Konidien in einem Obstgarten aufzufangen. Wenn Horne (1925) mitteilt, daß die durch *Stemphylium* verursachte Fäule unter allen anderen Fäulen (Braun-, Grün-, Grau- und *Fusarium*-Fäule) auf dem Lager am spätesten (etwa Mitte April) auftrete, so deckt sich diese Beobachtung mit der eigenen insofern, als festgestellt werden konnte, daß die Anfälligkeit der Früchte mit zunehmender Reife bzw. Lagerdauer steigt (Seite 247). Während eine unterschiedliche, durch die Sorte bedingte Empfindlichkeit in den eigenen Untersuchungen nicht ermittelt werden konnte (vgl. auch Björling 1945 a, dem an allen ihm zur Verfügung stehenden Apfelsorten die künstliche Infektion mit *S. congestum* Newton gelang), gibt Horne (1925) eine solche an. Danach sind u. a. „Ribston Pepping" und „Cellini" resistent, „Bismarck", „Lane's Prince Albert", „Cox Orange" und „Roter Astrachan" sowie die häufig verwendete Versuchssorte „Worcester Pearmain" (Horne 1933, Carter 1934 a und b) anfällig. Obwohl Horne und Horne (1920) feststellten, daß Früh- und Spätsorten unterschiedlich befallen wurden, gelingt es nicht, zwischen der Reifezeit der genannten Sorten und deren Anfälligkeit bzw. Resistenz irgendwelche Beziehungen aufzustellen; sowohl unter den resistenten wie unter den anfälligen Sorten befinden sich früh- und spätreifende („Ribston Pepping" spät, „Cellini" früh — „Bismarck" spät, „Roter Astrachan" sehr früh). Das ändert nichts an der Tatsache, daß die Äpfel mit zunehmender Lagerzeit immer fäuleanfälliger werden; je reifer die Früchte sind, um so weniger widerstehen sie der *Stemphylium*-Fäule. Horne und Horne (1920) vertreten die Ansicht, daß die Frage der Anfälligkeit bzw. Resistenz der Früchte nur durch das Studium der in ihnen mit der Jahreszeit wechselnden chemischen Verhältnisse geklärt werden kann. Horne (1925) konnte sich später konkreter äußern, nachdem er an Hand seiner Infektionsversuche festgestellt hatte, daß die Infektion um so besser gelang, je höher der Zuckergehalt und um so schlechter haftete, je höher der Säuregehalt der Früchte war. Da es von Natur aus saure und weniger saure Apfelsorten gibt, wäre damit die Erscheinung einer sortenbedingten Fäuleresistenz bzw. -anfälligkeit erwiesen und ihre Ursache geklärt. Es darf andererseits die Tatsache des mit zunehmender Reife parallel verlaufenden Säureabbaues bzw. Steigens des Zuckergehaltes, wie er in reifenden Früchten jeder Sorte erfolgt, nicht übersehen werden. Horne (1925) wies die zwischen der *Stemphylium*-Resistenz und dem hohen

Säuregehalt einiger Apfelsorten bestehende Korrelation nach, indem er den Pilz auf einem Fruchtextrakt des wenig sauren „Cox Orange" und des stark sauren „Lane's Prince Albert" verimpfte. Nach einer Expositionszeit von wenigen Tagen betrug der Koloniedurchmesser auf dem „Cox Orange"-Extrakt 25 mm, auf demjenigen von „Lane's Prince Albert" nur weniger als 3 mm.

Abschließend sei erwähnt, daß Horne und Horne (1920) an den sich auf infizierten Früchten entwickelnden Faulflecken Messungen anstellten, um eine Aussage über die Virulenz ihrer *Stemphylium*-Stämme machen zu können. Sie ermittelten Werte, die mit denen der eigenen Infektionsversuche gut übereinstimmten. Björling (1945 a) stellte nach künstlicher Infektion mit *S. congestum* Newton nach 20tägiger Bebrütung bei 20 °C einen Fleckendurchmesser von 20 mm fest. Der in Halle isolierte Pilz darf somit als ein *Stemphylium*-Stamm mittlerer bis hoher Virulenz angesehen werden. Da auf dem Lager die Ansteckungsgefahr gesunder durch kranke Äpfel groß ist (Horne und Horne 1920), sollte im Obstkeller neben den bekannten häufigen Fäulen auch auf ein eventuelles Auftreten der bisher in Deutschland unbekannten *Stemphylium*-Fäule geachtet werden.

Zusammenfassung

In Halle (Saale) wurde von einem Apfel, der einem Obstlagerungsversuch entstammte, *Stemphylium botryosum* Wallr. (Perfektform: *Pleospora herbarum* [Pers.] Rabh.) isoliert. Der Pilz verursachte eine Fruchtfäule, die als Lagerfäule besonders aus Amerika und England, aber noch nicht aus Deutschland bekannt ist. Infektionsversuche, Reisolations- und Reinfektionsversuche verliefen positiv. Die Anfälligkeit des Apfels gegenüber *S. botryosum* steigt mit der Genußreife, d. h. mit zunehmender Lagerzeit. Eine sortenbedingte Anfälligkeit bzw. Resistenz konnte an Hand der eigenen Versuche nicht ermittelt werden, sie soll aber, entsprechend einigen Literaturangaben, bestehen: wenig saure Sorten sollen stärker, stark saure Sorten nur wenig anfällig sein. Die Gefahr einer Ansteckung gesunder Äpfel durch kranke ist auf dem Obstlager groß.

Summary

Stemphylium botryosum Wallr. as the cause of a storage rot in apples in Germany

In Halle (Saale), *Stemphylium botryosum* Wallr. (perfect stage = *Pleospora herbarum* [Pers.] Rabh.) was isolated from an apple coming from a fruit storage test. The fungus caused a fruit rot that is known as a storage rot of apples, particularly from America and England, though not so far from Germany. Infection tests, reisolation and reinfection tests all gave positive results. The susceptibility of the apple to *S. botryosum* rises with the degree of ripeness, i. e. with increasing length of storage. Varietal differ-

ences in susceptibility or resistance could not be detected in our own experiments, though according to some data in the literature it does exist: very acid varieties are said to be only slightly susceptible while less sour varieties are more so. The danger of infection of sound apples by diseased ones in the store is high.

Der technischen Assistentin Frl. Helga Petroll, die mir bei der Durchführung der Experimente behilflich war, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank sagen.

Literaturverzeichnis

*Anonym, 1936: Forty-sixth annual report for the fiscal year ended June 30, 1936. Wash. st. agric. exp. sta. Bull. 342.

*Björling, K., 1945 a: En för Sverige ny äpplesjukdom. Växtskyddsnotiser, Växtskyddsanst., Stockholm, **3**, 45—48.

*— —, 1945 b: Fortsatta rön angående en nyligen beskreven äpplesjukdom. Växtskyddsnotiser, Växtskyddsanst., Stockholm, **6**, 92—94.

Carter, F. M., 1934 a: A brief account of fungi present in the air over orchards, with especial references to *Pleospora* and *Polyopeus*. Trans. British Mycol. Soc. **19**, 145—153.

— —, 1934 b: Investigations of factors effecting advance of certain "apple-spot" fungi within the host tissue. Ann. bot. **48**, 363—394.

*English, H., 1944: Notes on apple rots in Washington. Plant dis. reptr. **28**, 610—622.

*— —, and F. Gerhardt, 1942: Effect of carbon dioxide and temperature on the decay of sweet cherries under simulated transit conditions. Proc. Amer. soc. hort. sci. **40**, 172—176.

*Heald, F. D., 1930: Division of plant pathology. Fortieth ann. rept. Wash. agric. exp. sta. for the fiscal year ended June 30, 1930, Bull. 245, 47—50.

Horne, A. S., 1925: Fungal diseases of stored apples. Imp. bot. conference, July 1924, London. Rept. of proceedings, 363—372. Cambridge.

*— —, 1933: Biological work on fruit. Dept. sci. and ind. res., rept. food invest. board for the year 1932, 279—300.

— —, and E. V. Horne, 1920: Mycological studies. I. On the "spotting" of apples in Great Britain. Ann. appl. biol. **7**, 183—201.

Neergaard, P., 1945: Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. London.

Rose, D. H., and L. F. Butler, 1927: *Pleospora* rot of lemons and apples. Phytopathology **17**, 47.

*Ruehle, G. D., 1930: *Stemphylium congestum* and its relation to decay in apples. Mycologia **22**, 304—309.

* Die Arbeiten waren nur im Referat zugänglich.

From the Department of Agricultural Botany, Faculty of Agriculture, University of Khartoum, Sudan and the Botany School, Cambridge, England

Bacterial leaf spot of sesame (*Sesamum orientale* L.)

By

K. A. Sabet[1]) and W. J. Dowson

With 3 figures

INTRODUCTION

It has been assumed in the Sudan since Boughey (1942) first reported the leaf spot of sesame (*Sesamum orientale* L.) that the disease is caused by *Pseudomonas sesami* Malkoff. The disease was never investigated in this country and the identification of the causal organism was based on the symptoms of the disease which seem to agree with those reported earlier by Malkoff (1906), Takimoto (1927) and Nakata (1930). The last author compared the morphological, cultural and physiological characters of „*Bacterium*" *sesami* (Malkoff) Nakata, with „*Bacterium*" *sesamicola* Takimoto and „*Bacterium*" *solanacearum* (E. F. S.) E. F. S. and concluded that the first two organisms were identical but differed from the third. "*Bacterium*" *sesami* and "*Bacterium*" *sesamicola* were considered synonymous and the name *Pseudomonas sesami* Malkoff was revived by Elliott (1951). Kovacevski (1930) concluded from his experiments that of the two bacteria isolated by Malkoff only one was pathogenic. This was probably a *Pseudomonas* as it had several polar flagella and formed a greyish growth on potato. No further investigations have been carried out into the cause of the disease, though the same or a similar disease has been reported from different places in Europe, Asia, Africa and North and South America (Elliott, loc. cit.).

THE DISEASE IN THE SUDAN

Leaf spot disease of sesame "Marad ed Dum" is widespread in the Sudan and often severe under rain-cultivation. It may be responsible for heavy losses of the crop. The disease occurs in the central rainlands and the western parts of the country where large areas of sesame are grown.

[1]) Present address: Faculty of Agriculture, University of Cairo, Egypt, U.A.R.

Two types of symptoms usually appear together in sesame fields and sometimes on the same plant or leaf. In one, the symptoms suggest some resemblance to the disease reported by MALKOFF (1906). The first signs appear as minute, dark olive-green spots which increase in size becoming 2—3 mm in diameter in about ten days and attain a dark red-brown to black colour. The spots are round but often angular and remain small but may coalesce to form larger blotches (Fig. 1). The dead tissue of the spots later dries and becomes brittle. The stems and capsules are infected, and oval, slightly

Fig. 1. Sesame leaf showing leaf spots caused by *Xanthomonas sesami* sp. nov. (3/4 natural size approx.)

Fig. 2. Sesame leaf showing another type of spot (probably physiological) (3/4 natural size approx.)

Fig. 3. Stalk and capsules (leaves removed), showing bacterial spots (× 1/7 approx.)

raised, dark red-brown lesions are produced (Fig. 3).

In the other type, symptoms appear suddenly on the leaves as large, light or greyish brown angular blotches 6—12 mm or more in diameter (Fig. 2). These blotches develop shortly after heavy rains. Isolations from the blotches revealed no pathogenic organism and in many instances no organism of any kind appeared on the plates. These symptoms do not usually appear on the stems or capsules.

The two types of symptoms, though easily distinguishable, are referred to one disease namely "Marad ed Dum". The first type is the commoner and is definitely due to a pathogen. The disease caused is the one referred to below and will be designated "bacterial leaf spot". The other type seems to be more likely due to physiological causes, possibly rain damage following waterlogging of the tissues.

ISOLATION EXPERIMENTS

Affected material was collected by the writer from different localities in Kordofan Province in the west, in October 1956 and from central rainlands in the east, during October 1958. Material was also received from Sayed Hussein Idris of Tozi Central Rainlands Experimental Station during August and September 1958. The lesions on the leaves, stems and capsules were cut out, surface sterilized in 30 % hydrogen peroxide for 30 seconds and teased in a few drops of sterile water. The resulting bacterial suspension was streaked on yeast extract-glucose (1 %) agar plates which were incubated at 29 °—30 °C. The minute, yellow, wet-shining, convex colonies of the causal agent appeared after 2—3 days.

Some difficulty was encountered in isolating the cause of the disease because affected materials had to be brought from far districts and were used for isolation not less than 10 days after they were cut. The sesame plants, being succulent, rotted easily and it was not possible to avoid contaminants appearing on isolation plates. A glistening, greyish, raised bacterium and another glistening, yellow slightly raised one often appeared on the plates.

INOCULATION EXPERIMENTS

Pathogenicity tests

Many attempts were made during 1957 and 1958 to examine the pathogenicity of several, culturally distinct isolates obtained from infected sesame by using a few weeks to six months old potted plants of different varieties of sesame. The bacterial suspensions were prepared from 48—72 hrs. old cultures grown on yeast extract-glucose agar and sprayed on the plants with the aid of an atomizer. The plants then were covered with glass bell jars for 48 hrs. Control plants were sprayed with sterile water and treated in the same way. No disease symptoms developed on any of the inoculated and control plants.

In late 1958 and early 1959, the pathogenicity of the isolates was re-examined and potted as well as field-grown plants were used concurrently. Sesame was sown in the field in rows about 80 cm apart in October i. e. after the end of the rainy season. Two to four weeks later, small separate patches in the rows, each consisting of about twenty plants were selected at random and hardboard partitions, 60 cm high were laid down to the north and south of each patch to minimise dissemination of the bacteria by the northern wind. The plants were inoculated when 4—6 weeks old and about 30 cm or more high. Potted plants sown at the same time were only 10 to 15 cm high. Four varieties of sesame were used. Of each variety, two field patches chosen at random and two pots containing 10 plants each were inoculated with any one isolate. The pathogenicity of isolates Ses. 1, 2, 9, 10 and 11 suspected to be species of *Xanthomonas* was tested in this manner together with isolates Ses. 3 (glistening, greyish and raised) and Ses. 4 (glistening, yellow and slightly raised). The latter two isolates were inoculated only into the varieties Local Heavy Black and Hindi. Bacterial suspensions were prepared as above and sprayed onto the potted plants which then were watered and covered with glass bell jars. Control plants were similarly treated but sprayed with sterile water.

All isolates, with the exception of Ses. 3 and Ses. 4 reacted in the same way. They produced no effects on potted plants of all the varieties of sesame used. On field grown plants, disease symptoms first appeared after 7—12 days as minute, dark olive-green spots which increased in size becoming 2—3 mm in diameter and attained a dark red-brown to black colour. All inoculated plants were infected to varying degrees while the control ones showed no sign of illhealth. As regards the isolates Ses. 3 and Ses. 4 no symptoms developed on potted or field grown plants and they were thus considered non-pathogenic.

Infection experiments at Cambridge

One dozen sesame plants were raised in John Innes compost in the glasshouses at Cambridge from seed sent by Dr. K. A. Sabet. The average humidity was about 80 and the temperature ranged about 80 °F. (32 °C.). When the plants were about 30 cm high, three were inoculated by spraying both surfaces of the leaves with a suspension of *Xanthomonas sesami* on

March 17th, 1959. One plant was sprayed with water only to serve as a control. After three weeks some of the leaves in the middle of the three inoculated plants showed numerous nearly round black spots about 2 mm in diameter from some of which *Xanthomonas sesami* was reisolated. The control plant was not affected. On April 13th, 1959 four more plants of the same sowing, which by that time had grown tall and lanky, were inoculated in the same way but without result.

The experiments were repeated on a further set of plants raised in a less humid part of the glasshouse and when about 20 cm high they were inoculated on July 2nd, 1959 by spraying in the same manner as before.

On July 28th a number of round black spots with pale borders developed, mostly on the lower leaves. In no experiment were the stems affected. The same organism was reisolated from the spots.

It was concluded from these experiments that the bacterium isolated by Dr. SABET who proved its pathogenicity on field plants but not on pot plants was indeed pathogenic to pot plants grown under glass at Cambridge and produced lesions on the leaves similar to those described by ELLIOTT (1951).

Under the artificial conditions of the glasshouse the disease was not serious and produced lesions only on the middle and lower leaves of comparatively young plants.

Those isolates which reproduced the disease were re-isolated from infected leaves some six weeks after inoculation. The typical colonies of the pathogen appeared on isolation plates in almost pure cultures.

Cross inoculation

Isolates Ses. 1 and Ses. 9 were inoculated into potted and field-grown plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.), castor (*Ricinus communis* L.), tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.), jute (*Corchorus olitorius* L.), cotton (*Gossypium barbadense* L.), catjang cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), Soyabean (*Glycine Soja* Sieb. and Zucc.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and dolichos bean (*Dolichos lablab* L.). Only potted plants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) were used. The method of inoculation used was essentially similar to that described for sesame experiments with minor modifications to suit the habit and rate of growth of the different host species. Five to twenty potted plants of each host and a similar number of field-grown ones were inoculated with each of the two selected isolates.

None of the plants, potted or field-grown, showed any sign of illhealth.

DESCRIPTION OF SESAME PATHOGEN

The following description of the cause of the bacterial leaf spot disease of sesame is based on the study of five isolates and the re-isolate of each. The methods adopted for pure culture studies were those recommended by DOWSON (1957). The cultures were kept at 29 °—30 °C. except where otherwise stated. Biochemical characters were compared with a recently isolated

strain of *Xanthomonas malvacearum* (E. F. S.) Dowson, and another of *Xanthomonas phaseoli* (Smith) Dowson both of which were isolated by K. A. SABET (1959) from *Gossypium barbadense* and *Dolichos lablab* respectively. Action on carbon sources was tested in 1 % solutions of the sugars, polyhydride alcohols and salicin, and in 0.2 % solution of the starch in a peptone-free basal solution. Bromo thymol blue was added to the medium as indicator.

The cause of the sesame disease is a Gram-negative, capsulated, short rod measuring, in hanging drops 0.4—0.6 μ × 0.8—1,6 μ (average 0.5 μ × 1.1 μ). It is motile and has one polar flagellum (GRAY's method).

The organism grows well on yeast extract-glucose (1 %) agar. On plates, it produces minute, slimy, yellow, round, convex colonies which become raised, 7—10 mm in diameter with entire margins after seven days. The growth on slopes is smooth, yellow, slightly viscid, wet-shining and filiform. On nutrient-glucose agar a somewhat similar but less luxuriant and lighter yellow growth is produced. On potato plugs the growth is yellow, slimy and moderate. In yeast extract and nutrient broths, supplemented by 1 % glucose, fine turbidity and a yellow ring are produced.

Acid but no gas is evolved from arabinose and xylose with slight turbidity of the cultures, and from fructose, mannose, galactose, lactose, maltose, sucrose, raffinose, glycerol and mannitol with moderate to good growth. No acid is produced from rhamnose, sorbitol and salicin. Starch is hydrolysed slowly; hydrolysis is negative or doubtful in cultures less than 30 days old. Hydrogen sulphide and ammonia are produced with strong reactions. Indol and nitrites are not produced from tryptophane and nitrate respectively. Gelatine and LÖFFLER's blood serum are liquefied in about two weeks. Litmus milk is cleared slowly without coagulation; the litmus is reduced, then re-oxidised at the top which becomes purple.

The sesame pathogen differs from *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas malvacearum* in its slow action on starch which the latter two organisms hydrolyse in five days, in its ability to liquefy LÖFFLER's blood serum, in the moderate growth it produces on potato plugs compared with the luxuriant growth produced by the other two species and in some other minor characters. The sesame pathogen produces acid from mannitol which substance is not utilized by *Xanthomonas malvacearum*.

IDENTITY OF THE PATHOGEN

It is not quite clear whether the disease under investigation is the same as that first reported by MALKOFF (1906) or a different disease. The symptoms of the two diseases are similar in many respects e. g. colour, shape and development of the spots. But while the disease outside the Sudan is now attributed to a species of *Pseudomonas* namely *Pseudomonas sesami*, the disease in this country is evidently caused by a species of *Xanthomonas* Dowson. The writers have not been able to obtain a culture of the former pathogen for comparison, but from the description given by ELLIOTT (1951), there seems to be no doubt that *Pseudomonas sesami* is properly ascribed to the genus *Pseudomonas*.

The species of *Xanthomonas* that causes the disease in the Sudan is confined to *Sesamum orientale* and is therefore considered as a new species for which the epithet "*sesami*" is proposed.

Summary

Two types of sesame leaf spot occur in the Sudan both of which are referred to one disease namely "Marad ed Dum". In the first small, dark red-brown to black spots develop on the leaves, stems and capsules. In the other, the spots are much larger, light brown in colour and do not usually appear on the stems and capsules. From the former type of spots, a *Xanthomonas* sp. has been isolated which reproduces the disease in field grown, and potted plants of sesame under humid conditions. For the reasons discussed above, the cause of the bacterial leaf spot is considered as a new species for which the name *Xanthomonas sesami* sp. nov. is proposed.

From the other light-brown type of leaf spot, no pathogens could be isolated. This type is probably due to a physiological disorder e. g. rain damage.

Zusammenfassung

Im Sudan kommen auf Sesam (*Sesamum orientale* L.) zwei Typen von Blattflecken vor. Beide werden einer einzigen Krankheit zugesprochen, welche „Marad ed Dum" genannt wird. In einem Fall entwickeln sich auf Blättern, Stengeln oder Kapseln kleine, dunkel rotbraune bis schwarze Flecke; im zweiten Fall sind die Flecke größer und hellbraun gefärbt und treten gewöhnlich auf Stengeln und Kapseln nicht auf. Aus Flecken des ersten Types konnte ein *Xanthomonas* isoliert werden. Im Übertragungsversuch vermochte dieses Bakterium die Krankheit wieder hervorzurufen, und zwar sowohl im Feld wie auch bei unter feuchten Bedingungen gehaltenen Topfpflanzen. Da es sich um einen bisher unbekannten Erreger handelt, wird er als *Xanthomonas sesami* neu beschrieben.

Hingegen konnte vom zweiten Blattfleckentyp mit größeren, hellbraunen Flecken kein Erreger isoliert werden. Es handelt sich bei dieser Erscheinung wahrscheinlich um eine physiologische Störung, möglicherweise hervorgerufen durch Regenschädigung.

Literature cited

Boughey, A. S., 1942: List of economic plant diseases. Dept. Agric. & For., Sudan Govt.

Dowson, W. J., 1957: Plant diseases due to bacteria. Univ. Press, Cambridge.

Elliott, C., 1951: Manual of bacterial plant pathogens. Chronica Botanica, Mass., USA. p. 87.

Kovacevski, J. C., 1930: Ann. Univ. Sofia **8**, 455, in Rev. Appl. Myc. **9**, 698.

Malkoff, K. W., 1906: Weitere Untersuchungen über die Bakterienkrankheit und *Sesamum orientale*. Cbl. Bakt. Paras. Inf. **16**, 664.

Nakata, K., 1930: Comparative studies of *Bacterium sesami* with *Bacterium solanacearum* and *Bacterium sesamicola*. Ann. Phytopath. Soc. Japan **3**, **229** (Rev. Appl. Myc. **9**, 577, 1930).

Sabet, K. A., 1959: Studies in the bacterial diseases of Sudan crops. Ann. appl. Biol. **47**, 318.

Takimoto, K., 1927: Sesame bacterial disease. J. Plant Protection (Tokyo) **8**, 433.

From the Section of Virology, Instituto Agronomico, Campinas, Brazil

Mechanical Transmission and Properties of the *Abutilon* Mosaic Virus

By

A. S. Costa and Ana Maria Carvalho

With 4 figures

Table of contents: I. Introduction. — II. Material and methods. — III. Influence of several factors on mechanical transmission. A. Test plant. B. Sources of inoculum. C. Temperature during preparation of the inoculum. D. Effect of diluents on virus activity in the inoculum. E. Influence of pH on the infectivity of the virus suspension. — IV. White fly transmission of virus from plants infected mechanically. — V. Recovery of *Abutilon* mosaic virus by mechanical inoculation from *Malvaceae* collected in various parts of the state. — VI. Properties of the *Abutilon* mosaic virus from *Sida*. A. Resistance to aging in vitro. B. Dilution end point. C. Thermal inactivation. D. Resistance to alcohol. — VII. Discussion. — Summary. — Zusammenfassung. — Literature cited.

I. INTRODUCTION

Mechanical transmission of viruses of the *Abutilon* mosaic group has been attempted by several investigators without success (Baur 1904, Lindemuth 1907, Hertzsch 1928, Kunkel 1932, Klebahn 1932, Costa 1937, Silberschmidt 1943, Hollings 1959). Positive results were reported in a single instance (Crandall 1954), but have been questioned (Costa 1955). The senior writer also tried without success (Costa 1955) to transmit mechanically a virus that belongs to the *Abutilon* mosaic virus complex and affects native and cultivated *Malvaceae* and other plants in Brazil. More recently, however, the introduction of some untried species in the tests has made possible to obtain mechanical transmission of this virus with a high degree of success. In addition, *Abutilon* mosaic virus from *Abutilon striatum* Dicks. var. *thompsonii* Veitch[1]) was transmitted mechanically with inoculum from *Sida micrantha* St. Hil. plants to which the virus had been transferred by grafting.

1) The writers are indebted to Dr. K. Silberschmidt, Instituto Biologico, Brazil, for supplying cuttings of this species obtained from the United States.

The satisfactory results obtained in the mechanical transmission of the virus when cheeseweed seedlings (*Malva parviflora* L.) were used as test plants have enabled the writers to determine some of the properties of the virus in vitro and to carry out studies on some factors concerned with this method of inoculation.

II. MATERIAL AND METHODS

Plants used in the tests were raised in a greenhouse sprayed in a routine manner against insects and mites. The seedlings were planted in 8-inch, painted aluminum pots, mostly two plants being set in each pot. The majority of the tests was carried out with cheeseweed seedlings. Other species of *Malvaceae* and plants of other families used in comparative tests were raised in a similar manner.

The main sources of *Abutilon* mosaic virus (hereafter referred by its initials AMV) used in the tests and particularly in those aimed at determining the properties of the virus in vitro were obtained from naturally infected native weeds of the genus *Sida* and mostly from *Sida micrantha* and *Sida rhombifolia* L. A few experiments were also carried out with virus from *Abutilon striatum* var. *thompsonii*.

Unless otherwise specified, all inocula were prepared by crushing diseased leaves in a sterile mortar in the presence of 0.02 M phosphate buffer at pH 7 to which sodium sulfite had been added to reach a 0.02 M concentration. The diluent or water was added in varying proportions to the infected tissues, but in most cases at the rate of 5 : 1. Inoculum from *Malvaceae* species is usually sticky and difficult to use without dilution.

In the early tests preparation of the inocula was made at a low temperature. Comparative tests showed later that extraction at a low temperature was not necessary to preserve AMV activity in the inocula and since then all steps were carried out at room temperature.

The inoculations were made by dipping the fingers in the inoculum and rubbing them on the carborundum (600-mesh) dusted leaves of the test plants.

III. INFLUENCE OF SEVERAL FACTORS ON MECHANICAL TRANSMISSION

A. Test plant

The use of a suitable plant such as *Malva parviflora* or a few other species of the genus was the main factor that permitted the writers to achieve good results in the mechanical transmission of the AMV. The *Malva parviflora* seed source used in the tests was collected in the Salinas Valley, Calif. Another species present in that area, probably *Malva rotundifolia* L., and a rather similar type that the senior writer collected in Braunschweig, Germany were also susceptible to the virus in mechanical inoculation tests, but less so than *Malva parviflora*. Seeds of a *Malva* species that looks identical

to *Malva parviflora* were collected near Campinas more recently. This source also proved to be as susceptible to AMV when inoculated mechanically as *Malva parviflora* from California.

In a series of tests, several known host plants of the AMV as determined by insect inoculations were compared as to their susceptibility to the virus when inoculated mechanically. The results of these miscellaneous tests, in most of which inoculum from *Malva parviflora* or from *Sida micrantha* was used, are presented in table 1. They indicate that *Malva parviflora* is by far

Table 1

Results of tests to compare the susceptibility of various species of plants to mechanical inoculation with the AMV

Species tested	No. of tests	Plants	
		Inoc.	Infect.
Datura stramonium L.	7	89	6
Gossypium hirsutum L.	2	95	1
Lycopersicon esculentum Mill.	1	20	0
Malva parviflora L.	21	338	217
Malva rotundifolia L.	14	210	80
Nicandra physaloides Gaertn.	11	185	29
Nicotiana tabacum L. (Turkish)	3	30	1
Sida micrantha St. Hil.	9	112	6
Sida rhombifolia L.	2	36	1
Sida bradei Ulbricht	1	10	0
Solanum tuberosum L. (seedlings)	1	10	0

the most susceptible test plant from those tried. *Malva rotundifolia* was also a good test plant. *Nicandra physaloides* behaved inconsistently. In most tests with this species the transmission results were very poor, but 5 plants out of 6 were infected in one test and 14 out of 40 in another. *Sida micrantha* and *Sida rhombifolia*, species that are very susceptible to the AMV when inoculated by means of the vector, were highly resistant when inoculated mechanically. Cotton plants are fairly susceptible to the virus in insect inoculations, but they too were extremely resistant when inoculated mechanically.

Symptoms induced by the AMV on cheeseweed

Infected plants of this species show the typical yellow mottle characteristic of the disease on various host plants. In addition to mosaic, the leaves show crinkling, and the whole plant is somewhat stunted (Figure 1).

Plants inoculated mechanically show the presence of yellow stretches of the small veins (Figure 2) as the first systemic symptom, followed by yellow mosaic spots, and crinkling (Figure 3). Certain virus sources induce yellow mosaic mostly along the veins or yellow spots limited by the veins. The whole leaves of some plants may turn yellow with only a few scattered

Figure 1. Diseased plants of *Malva parviflora* showing severe symptoms

areas of green tissues. In case of some virus sources the mosaic spots are light green and not yellow. Leaf malformation accompanying the mosaic symptoms was noticed in many cases.

Local necrotic lesions, surrounded by a light green or yellow area (Figure 4), were shown by many plants on leaves that had been rubbed with the inoculum. The AMV was recovered from the necrotic lesions, thereby indicating that they were caused by the virus. However, production of local lesions is not consistent and they are not suitable for counts. The search for a suitable local-lesion test plant for this virus has been negative so far.

In some instances cheeseweed seedlings infected with the AMV by mechanical inoculation show, in addition to mosaic symptoms, an umbrella-like rolling of the leaves downwards, followed by severe stunting and sometimes death of the plant.

Inoculation on the upper or lower side of the leaves

Tests were made to compare the susceptibility of the upper and lower side of the leaves to the virus when introduced by mechanical inoculation. In each of 3 tests cheeseweed seedlings were inoculated on the upper side of their leaves whereas another comparable group of plants received the same inoculum applied on the underside of the leaves. Out of 8 seedlings that were thus inoculated in

Figure 2. Infected leaf of *Malva parviflora:* yellowing of short stretches of the small veins and small yellows areas limited by veins

each test, the number of affected plants was 1, 6, and 4 for those inoculated on the upper side; and 2, 5, and 5 for the inoculations made on the lower side. These results indicate that the susceptibility of the two sides of the leaves is about the same.

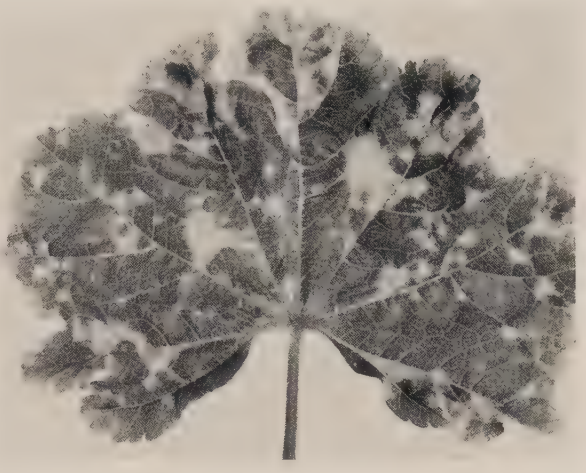


Figure 3. Infected leaf of *Malva parviflora*: yellow spots limited by the veins and leaf crinkling

Inoculation of young versus old leaves

Three tests were carried out to compare the susceptibility of young and old leaves of cheeseweed seedlings to mechanical inoculation with the AMV. In each of the tests 10 plants were inoculated on the 3 youngest leaves and another comparable group on the 3 oldest leaves. The infection results were 9, 9, and 10 for the plants inoculated on the young leaves; 0, 0, and 1 for those inoculated on the old leaves. In spite of these results, very young cheeseweed seedlings were not so good as test plants as seedlings that already had 3, 4 and 5 leaves.

Pre-conditioning test plants in the dark

Figure 4. Symptoms shown by *Malva parviflora* leaf following mechanical inoculation: necrotic local lesions surrounded by a yellow area

In preliminary tests it was verified that pre-conditioning the cheeseweed seedlings in the dark for one or two days prior to inoculation did not increase their susceptibility to the AMV when applied mechanically. This procedure was also tried in case of other host plants that had been tested before by mechanical inoculation unsuccessfully, but the treatment did not make them susceptible.

B. Sources of inoculum

The inoculum from different species of plants affected by AMV varies considerably

in infectivity when tested by mechanical inoculation. The results from miscellaneous tests aiming at comparing inocula from different plant sources are given in table 2. They show that the *Malvaceae* host plants were the best sources, except for cotton and okra that were poor. Among the solanaceous host plants, *Nicandra physaloides* and tomato plants gave poor results. A comparison of inoculum from three tobacco varieties, "White Burley", "Amarelinho", and a local selection of "White Burley" showed that the latter supplied a better inoculum than the others. Two months after the first test, recovery attempts were repeated with inoculum from the same plants. The three sources supplied good inoculum. Virus was recovered from various leguminous species by mechanical inoculation, but they did not seem to be promising as virus sources.

Table 2

Results from transmission tests in which two species of *Malva* were inoculated with virus from various sources

Species tested as virus sources	*Malva parviflora*			*Malva* sp.		
	No. of tests	Plants		No. of tests	Plants	
		inoc.	infect.		inoc.	infect.
Abutilon striatum Dicks. var. *thompsonii* Veitch	3	80	0	-	—	—
Arachis hypogea L.	1	5	2	—		—
Canavalia ensiformis DC.	1	10	0		—	—
Datura stramonium L.	2	18	0	—	-	—
Glycine max. (L.) Merr.	3	26	4	—	—	-
Gossypium hirsutum L.	1	6	0	1	4	0
Hibiscus esculentus L.	1	6	0	1	4	0
Lycopersicon esculentum Mill.	3	26	0	—	—	
Malva parviflora L.	8	74	57	6	37	18
Malva sp.	6	46	32	5	32	19
Nicandra physaloides Gaertn.	7	64	13	5	24	1
Nicotiana tabacum L.	3	46	12	—	—	—
Phaseolus vulgaris L.	1	10	2	1	4	0
Sida micrantha St. Wil.	7	56	48	4	28	10
Sida rhombifolia L.	4	34	28	4	28	1
Solanum tuberosum L. (seedl.)	3	22	2	—	—	—

The growth stage of the infected plants that supplied the inoculum was of great importance. Plants at a growth standstill gave inoculum of low infectivity. Young leaves with severe symptoms from plants still growing generally gave the best inoculum.

In addition to the test with tobacco plants already mentioned, another experiment was carried out in which inoculum taken from the same plants was tried after different intervals. Since these plants had been transplanted

to large pots, they kept growing and only the new growth was used as virus source. The results of the tests are in table 3.

Table 3

Results of tests comparing inoculum from the same plants, tested at various intervals

Source of virus	Number of cheeseweed seedlings infected out of 10 that were inoculated at the indicated data			
	May 30	June 14	July 2	July 22
1. *Malva parviflora* L.	7	8	8	9
2. *Malva parviflora* L.	1	0	—	1
3. *Sida micrantha* St. Hil.	—	9	6	5

They show that one of the *Malva parviflora* sources was good and the other, poor. They remained so over a period of about two months. The source from *Sida micrantha* was good and was still giving good transmission after the same period.

Transmission of AMV from *Abutilon striatum* var. *thompsonii* to test plants of *Malva parviflora* was consistently negative. When the virus was transmitted first to *Sida micrantha* by grafting, inoculum obtained from this species gave positive transmission, although not so good as some of the best sources from *Sida* or *Malva* plants.

C. Temperature during preparation of inoculum

Most of the early tests on the mechanical transmission of AMV were carried out with inocula extracted at temperatures near 4 °C, obtained by cooling the plant material, diluent, and mortar in the freezing compartment of a standard refrigerator just before extraction. This was done under the assumption that the AMV was rather unstable and that extraction at low temperatures would help to preserve virus activity in the inoculum.

Table 4

Results of tests comparing the infectivity of AMV inoculum extracted at low and room temperatures

Test No.	Number of cheeseweed plants inoculated and infected when the inoculum was extracted at			
	low temperature		room temperature	
	inoc.	infect.	inoc.	infect.
1	20	10	20	11
2	20	11	20	8
3	17	8	15	4
4	20	5	20	11
Totals	77	34	75	34

A series of four tests was then carried out to compare the activity of virus preparations extracted at low and at room temperatures. The results of these tests are presented in table 4 and indicate that there was practically no gain in extracting the inoculum at a low temperature.

D. Effect of diluents on virus activity in the inoculum

Tests were made to determine the effect of a few diluents on the activity of the AMV as measured by mechanical transmission tests. The results are on table 5. They indicate that extraction in 0.02 M phosphate buffer, in 0.02 M sodium sulfite, or in a mixture of both was generally better than in water, although in some tests the results obtained with water were comparable to the other treatments.

Table 5

Results of tests comparing the effect of various diluents on the activity of the AMV

Diluents	Number of cheeseweed plants infected out of 10 that were inoculated in 6 tests with virus preparations extracted in presence of the indicated diluent					
	1	2	3	4	5	6
Water	—	—	—	5	0	6
Buffer 0.02 M	7	4	0	7	2	5
Sodium sulfite 0.02 M	—	—	—	8	3	7
Buffer plus sodium sulfite	8	6	2	7	3	6

E. Influence of pH on the infectivity of the virus suspension

In 3 tests the extraction of the inocula was effected in the presence of 0.02 M phosphate buffer at pH 5, 6, 7, and 8. Out of a total of 18 plants that were inoculated in the 3 tests, the number of plants infected was respectively 16, 18, 17, and 17. These results indicated that the pH of the suspension used as a diluent for virus extraction had practically no effect on activity within the range tried.

IV. WHITE FLY TRANSMISSION OF VIRUS FROM PLANTS INFECTED MECHANICALLY

A few tests were made to establish whether or not the virus being transmitted mechanically was the same that was transmitted by *Bemisia tabaci* Genn. In these tests, non-viruliferous vectors were fed for 1 or 2 days on cheeseweed plants that had been infected previously by mechanical inoculation. After the acquisition feeding the white flies were transferred onto healthy seedlings of the same species or onto *Sida micrantha* plants. Out of 10 miscellaneous plants that had been originally infected mechanically, the white flies picked up virus from 9. Their efficiency in transmission was

apparently the same as if they had been fed on plants infected previously by means of the vector. Also, the symptoms obtained by means of the vectors were not different from those obtained by mechanical inoculation. The failure in a single case is to be attributed to the small number of vectors that remained alive after the acquisition feeding.

V. RECOVERY OF *ABUTILON* MOSAIC VIRUS BY MECHANICAL INOCULATION FROM *MALVACEAE* COLLECTED IN VARIOUS PARTS OF THE STATE

Sida plants infected with AMV were collected from various parts of the state of São Paulo and then used as inoculum on *Malva parviflora* test plants. From 14 collections of *Sida micrantha*, the AMV was recovered by mechanical inoculation in 9 cases. *Sida rhombifolia* was collected in 9 instances, but virus was recovered from them only in 3 cases. From 11 collections of infected, non-identified *Sida* species, 5 gave positive results when inoculated mechanically on the test seedlings.

Malva parviflora plants infected with virus sources collected from different areas showed approximately the same range in symptom variation as that obtained with material collected in the area around Campinas.

VI. PROPERTIES OF THE *ABUTILON* MOSAIC VIRUS FROM *SIDA*

All tests to determine the physical properties of the AMV from *Malvaceae* in São Paulo were made with inoculum originally obtained from *Sida micrantha* or from *Sida rhombifolia.*

A. Resistance to aging in vitro

Tests to determine the resistance of the AMV to aging in vitro were carried out with inoculum extracted in water or in a mixture of buffer and sodium sulfite. The diluents were added to the leaves and strained through

Table 6

Results of tests to determine the resistance of the AMV to aging in vitro

Aging of inoculum (hours)	Number of plants inoculated and infected with inoculum treated as indicated			
	Water		Buffer plus sodium sulfite	
	inoc.	infect.	inoc.	infect.
0	30	20	72	57
6	30	10	36	20
12	30	9	54	23
24	30	4	72	32
48	30	1	72	16
96	30	0	36	0

double muslin. The inoculum thus obtained was stored in stoppered vials and then applied to the test plants at the planned intervals. The results of the tests are in table 6. They show that some virus activity was still present in diseased juice prepared with water after storage for 24 hours and in a single case after 48 hours. When the inoculum was prepared in the presence of buffer plus sodium sulfite, there was still active virus in the inoculum after 48 hours, but not after 96 hours.

B. Dilution end point

Tests to determine the dilution end point were made with virus extracted and diluted with buffer and sodium sulfite. The results are presented in table 7. In 3 of the tests the virus did not withstand dilutions beyond 1 : 25, but in others it was still active in suspensions diluted to 1 : 625, although most of the activity had been lost.

Table 7

Results of tests to determine the dilution end point of the AMV

Dilution of inoculum	Number of cheeseweed plants infected in each of six tests out of 6 that were inoculated with a virus suspension diluted as indicated					
	1	2	3	4	5	6
1 : 1	5	5	5	3	5	4
1 : 5	2	6	5	4	6	4
1 : 25	2	0	0	2	6	2
1 : 125	0	0	0	3	4	2
1 : 625	0	0	0	0	2	1

C. Thermal inactivation

The tests on thermal inactivation were carried out with virus suspended in buffer plus sodium sulfite. The results of 6 tests are given in table 8. They indicate that the AMV is little resistant to heating and that most of the virus

Table 8

Results of tests to determine the inactivation temperature of the AMV

Temperature	Number of cheeseweed plants infected out of 16 that were inoculated in each of 6 tests with inoculum heated for 10 minutes at the indicated temperature					
°C	1	2	3	4	5	6
Not heated	10	13	10	16	9	16
45	5	2	9	2	4	13
50	2	0	7	0	1	3
55	1	0	2	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0

activity is lost at 50 °C. In three instances plants were infected with inoculum that had been heated at 55 °C.

D. Resistance to alcohol

Suspensions of the AMV were stirred with absolute ethyl alcohol in such proportions as to reach concentrations of 25, 50, and 75 per cent alcohol. The inocula thus treated were left standing for half an hour and then inoculated on *Malva parviflora* test plants. The inoculated leaves were washed with water right after inoculation to prevent burning. In two tests the number of infected plants out of 8 that were inoculated with the three alcohol-treated virus suspensions in decreasing concentrations and with the control was, respectively, 0, 0, 4, and 6 in the first test and 0, 0, 6, and 7 in the second. These data indicate that the AMV retained most of its activity after half an hour in 25 per cent alcohol. The two higher concentrations destroyed infectivity.

VII. DISCUSSION

Attempts made in the past by several investigators to transmit the *Abutilon* mosaic virus or other strains of this complex by mechanical methods have been unsuccessful. In one instance positive transmission of a virus that occurs in Salvador and apparently belongs to this complex was reported (Crandall 1954). It was pointed out (Costa 1955) that the results from Salvador could not be reproduced in Brazil with an apparently identical virus that infects species of *Malvaceae* and other plants in São Paulo.

The discovery that *Malva parviflora* and other species of the genus are suitable test plants for the mechanical transmission of the *Abutilon* mosaic virus present in São Paulo changed completely the view concerning its non-transmissibility by mechanical methods, although this possibility had been foreseen (Costa 1955). This finding also permitted the evaluation of several species of host plants as virus sources for mechanical inoculation. Inoculum obtained from cotton and from some legume plants was generally poor, even when tested on a susceptible host plant as cheeseweed. The susceptibility of many host plants of the virus was retested by mechanical inoculation. *Sida micrantha* and *Sida rhombifolia* that are easily infected by means of the vector were highly resistant to mechanical inoculation of the virus. Cotton plants were also extremely resistant in these tests. Thus, as it was stated before (Costa 1955), the results reported from Salvador still cannot be explained on the basis of our present knowledge on the mechanical transmission of the AMV. If the virus that infects *Malvaceae* and legume plants there can be transmitted easily by mechanical inoculation from cotton to cotton or from legume plants to cotton, it must be different from the virus complex that occurs commonly in São Paulo or else the cotton plants used in the tests behave differently from the several varieties that were tried here. It would be highly desirable to have the experiments in Salvador repeated to elucidate this point.

It is suggested by the results obtained in the tests with *Abutilon* mosaic virus from various sources that strains of the virus might differ in their ability to be transmitted mechanically. Virus from *Abutilon striatum* var. *thompsonii* seemed to be less infective than that usually found in species of *Sida,* even when the comparisons were made with inocula taken from the same plant species.

The possibility that virus sources transmitted mechanically to *Malva parviflora* with a high degree of success represented a virus different from the one normally occurring on native *Malvaceae* in São Paulo or just a strain of the virus complex has been considered. The fact that the mechanically transmissible virus sources were carried by *Bemisia tabaci* just as well as the insect sources, and that the symptoms induced by mechanical inoculation were identical to those obtained with the vector do not support this contention. Also, mechanical inoculation of the virus from infected plants growing in various parts of the state indicated that the virus commonly encountered in these areas is transmissible mechanically.

Lack of mechanical transmission of AMV in the past was assumed to be due to a very low stability of the virus outside the host. The results presented here show that this virus is not extremely unstable. Thus, the difficulty in obtaining its transmission by mechanical inoculation to various host plants that can be infected easily by means of the vector is probably connected in some way with the plants themselves. Two main alternatives might be suggested to explain these results: a) Establishment or multiplication of the AMV is dependent on a condition of the host plant parenchyma cells that is easily disrupted by substances or inhibitors present in the infective juice or that are formed as a result from the cell wounding necessary for virus penetration. Tissues of *Malva parviflora* or of other host plants that can be infected by mechanical inoculation would be less sensitive to these substances. If they are present in the inoculum, it is to be expected that the use of purified preparations of the virus would permit many of the resistant species to be infected by mechanical inoculation. b) The results obtained could be explained on the basis that the leaf parenchyma cells of the resistant species are so if the virus is introduced directly into them, but not resistant if virus is introduced first into the phloem tissues by the vector where a first increase could take place and from where the virus could then invade the other leaf tissues.

Cheeseweed plants inoculated on the younger leaves were more readily infected than comparable plants inoculated on the older leaves. However, young cheeseweed seedlings at the 2—3 leaf stage gave a lower transmission than plants at the 3—5 leaf stage. It may be that the young leaves of the slightly older plants develop at a faster rate than that of a corresponding leaf on a very young plant, thus making that type of leaf more adequate for virus establishment and increase. The better results obtained with the older plants could also possibly be due to the greater leaf area that is rubbed with the inoculum in the latter case and not to a higher susceptibility of the tissues.

Summary

Mechanical transmission of the *Abutilon* mosaic virus from native *Malvaceae* was obtained when *Malva parviflora* seedlings were used as test plants. Two other *Malva* seed sources, probably *Malva rotundifolia* were also susceptible to the virus applied mechanically, but less so than the former species. Mechanical transmission of AMV using as inoculum infected leaves of *Abutilon striatum* var. *thompsonii* was negative, but after the virus had been transferred to *Sida micrantha* by grafting, mechanical transmission with the inoculum from this plant was successful.

Sida rhombifolia, Sida micrantha, Gossypium hirsutum, and several other species that are easily infected by means of the vector were highly resistant to infection when virus was applied by mechanical inoculation.

Tests on *Malva parviflora* showed that infected plants of the same species as well as *Sida micrantha* and *Sida rhombifolia* were good sources of inocula. Inoculum was more infective when taken from young leaves from a growing plant showing severe yellow mosaic symptoms. *Nicandra physaloides, Lycopersicon esculentum,* and *Datura stramonium* gave generally inoculum of low activity, as well as some infected legume plants.

The AMV was found to remain active in infective juice stored for 24 and 48 hours at room temperature. Activity was higher in inoculum extracted in phosphate buffer plus sodium sulfite. Dilution of the inoculum to 1 : 25 produced infection and in two tests some activity was still present in inoculum diluted to 1 : 625. Most activity was lost in inoculum heated at 50 °C for 10 minutes, but a few cases of infection were obtained with inoculum heated at 55 °C.

Two hypotheses are suggested to explain the differences in susceptibility of the same plant species to insect and mechanical inoculation.

Zusammenfassung

Die mechanische Übertragung des *Abutilon*-Mosaikvirus (AMV) aus ververschiedenen in São Paulo einheimischen Malvaceen gelang auf Sämlinge von *Malva parviflora.* Zwei andere *Malva*-Arten, wahrscheinlich *Malva rotundifolia*-Formen, dienten ebenfalls als Testpflanzen für den Übertragungsversuch; sie erwiesen sich aber als bedeutend widerstandsfähiger als die erste Art. Eine Übertragung direkt aus dem Gewebe von *Abutilon striatum* var. *thompsonii* verlief negativ. Das Virus mußte zuerst durch Pfropfung auf *Sida micrantha* übertragen und erst dann mit dem Saft dieser Pflanze auf *Malva parviflora* gebracht werden.

Sida rhombifolia, Sida micrantha, Gossypium hirsutum und verschiedene andere Arten wurden wohl bei Übertragung mit Hilfe eines Vektors krank, sie erwiesen sich aber bei mechanischer Übertragung des AMV als widerstandsfähig.

Heranwachsende Pflanzen von *Malva parviflora, Sida micrantha* und *Sida rhombifolia* lieferten gutes Inoculum für die mechanische Übertragung auf *Malva parviflora*. Hingegen war der Erfolg mit Preßsäften aus *Nicandra physaloides, Lycopersicon esculentum, Datura stramonium* und einigen Leguminosen gering.

Preßsaft wurde durch 24stündiges, in einigen Fällen auch durch 48-stündiges Stehenlassen nicht inaktiviert.

In einer Phosphatpuffer-Natriumsulfit-Lösung war die Aktivität des Virus höher als im Wasser. Die Virusaktivität blieb auch bei Verdünnung des Inoculums auf 1 : 25, in zwei Fällen sogar auf 1 : 625 erhalten. Inoculum, das während 10 Minuten im Wasserbad bei 50 °C gehalten wurde, verlor meistens seine Aktivität; in einigen Fällen gelang die Übertragung aber noch nach Behandlung des Inoculums bei 55 °C.

Es wurden zwei Hypothesen zur Erklärung des Erfolgsunterschiedes bei mechanischer Übertragung oder bei Vektorübertragung auf dieselben Pflanzenarten diskutiert.

Literature cited

Baur, E., 1904: Zur Ätiologie der infektiösen Panaschierung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **22**, 453—460.

Costa, A. S., 1937: Nota sôbre o mosaico do algodoeiro. Rev. Agric., Piracicaba, **12**, 453—470.

— —, 1955: Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. Phytopath. Z. **24**, 97—112.

Crandall, Bowen A., 1954: Additions to the host and geographic range of *Abutilon* mosaic. Plant. Dis. Reptr. **38**, 574.

Hertzsch, W., 1928: Beiträge zur infektiösen Chlorose. Z. Bot. **20**, 65—85.

Hollings, M., 1959: Host range studies with fifty-two plant viruses. Ann. appl. Biol. **47**, 98—108.

Klebahn, H., 1932: Fortsetzung der experimentellen Untersuchungen über Alloiophyllie und Viruskrankheiten. Phytopath. Z. **4**, 1—36.

Kunkel, L. O., 1930: Transmission of *Sida* mosaic by grafting. Phytopathology **20**, 129—130.

Lindemuth, H., 1907: Studien über die sogenannte Panaschüre und über einige begleitende Erscheinungen. Landw. Jb. **36**, 807—861.

Silberschmidt, K., 1943: Estudos sôbre a transmissão experimental de clorose infecciosa das malvaceas. Arch. Inst. biol. (Def. agric. anim.) São Paulo **14**, 105—156.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase[1])

Von

R. Bossi

Mit 17 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — I. Kapitel. Methoden und Versuchsauswertung. — II. Kapitel. Tastversuche über die Wirkung der Fusarinsäure auf Katalase und Ascorbinsäureoxydase. — III. Kapitel. Der Einfluß der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase. — IV. Kapitel. Die Hemmung der Polyphenoloxydase durch Modellsubstanzen. — V. Kapitel. Die Polyphenoloxydase-Hemmung durch Fusarinsäure und ihre Bedeutung für die Schadwirkung an Tomatenpflanzen. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

Am Beispiel der Welkekrankheit der Tomaten konnte erstmals gezeigt werden, daß der Erreger *Fusarium lycopersici* Sacc. neben anderen Stoffwechselprodukten auch Toxine ausscheidet, die störend in die verschiedensten Lebensvorgänge des Wirtes eingreifen. Als solche toxische Stoffe des *Fusarium lycopersici* sind bis heute Fusarinsäure (Gäumann, Naef-Roth und Kobel 1952), Dehydrofusarinsäure (Stoll, Renz und Gäumann 1957), Lycomarasmin (Gäumann, Naef-Roth und Miescher 1950), Vasinfuscarin (Gäumann, Stoll und Kern 1953), Äthanol (Scheffer und Walker 1954) und Äthylen (Dimond und Waggoner 1953) beschrieben worden.

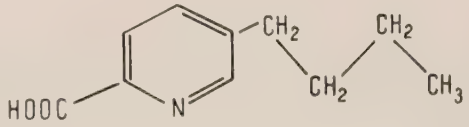
Untersucht man die Wirkung der einzelnen Toxine auf die Tomatenpflanze, so findet man, daß Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure Rillenbildung am Stengel, Epinastie der Blattstiele und Nekrosen auf den Blättern verursachen; Lycomarasmin löst ähnliche Schädigungen wie Fusarinsäure aus, nur unterbleibt die Rillenbildung am Stengel. Beim Vasinfuscarin könnte es sich um die von Gothoskar, Scheffer, Walker und Stahmann (1953) beschriebenen Pektin-abbauenden Enzyme handeln, die neben einer Verbräunung

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; ich möchte den zuständigen Behörden meinen Dank aussprechen.

der Leitungsbahnen ebenfalls Welkeerscheinungen im Blattwerk hervorrufen. Äthylen verursacht Epinastie der Blattstiele und Vergilben der Blattspreiten, und Äthanol verringert die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen.

Alle diese äußerlich sichtbaren Krankheitserscheinungen sind die Folgen einer Reihe von physiologischen Vorgängen, die durch das betreffende Toxin in der Pflanze ausgelöst wurden. In welcher Weise ein Toxin in den Stoffwechsel der Wirtspflanze eingreift, läßt sich freilich auf Grund der Symptome nicht entscheiden. Um die ausschlaggebenden Anfangsglieder der in einer kranken Pflanze ablaufenden Reaktionskette besser zu verstehen, soll in der vorliegenden Arbeit die Wirkungsweise eines einzelnen Toxins des *Fusarium lycopersici,* der Fusarinsäure, näher untersucht werden.

Fusarinsäure wurde erstmals von Yabuta, Kambe und Hayashi (1934) isoliert und ihre Konstitutionsabklärung und Synthese von Plattner, Keller und Boller (1954) durchgeführt. Es handelt sich um die 5 n-Butylpyridin-2-carbonsäure oder 5 n-Butylpicolinsäure der Bruttoformel $C_{10}H_{13}O_2N$ mit einem Molekulargewicht von 179.



Das Toxin wird nicht allein vom *Fusarium lycopersici* gebildet, denn bisher konnte es als Stoffwechselprodukt von sieben verschiedenen Pilzen, alle aus der Familie der Hypocreaceen, nachgewiesen werden (Gäumann 1957; Pace 1959). Dabei ist zu beachten, daß nicht alle diese Fusarinsäurebildner Erreger von Welkekrankheiten sind. Nur *Fusarium lycopersici* Sacc., *Fusarium vasinfectum* Atk., *Fusarium cubense* E. F. S. und gewisse Rassen des *Fusarium orthoceras* App. et Woll. können zu einem Welkezusammenbruch des Wirtes führen. Dieser kommt voraussichtlich erst im Zusammenspiel mit den weiteren Stoffwechelprodukten der Erreger zustande.

In der Literatur sind nur vereinzelt Angaben zu finden, die Anhaltspunkte geben, wie Fusarinsäure in den Stoffwechsel der Tomate eingreift. Beschrieben ist die Welkewirkung des Toxins (Gäumann, Naef-Roth und Kobel 1952) sowie der Einfluß, den es auf die Transpiration der Tomatenpflanzen (Gäumann, Kern, Schüepp und Obrist 1958), auf die Deplasmolysezeit pflanzlicher Protoplasten (Bachmann 1956; Gäumann und Loeffler 1957) und auf die Keimung von *Ustilago*-Sporen (Kern 1952) ausübt. Betrachten wir die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. (Reusser und Naef-Roth 1956) oder von Tomaten (Naef-Roth und Reusser 1954; Naef-Roth 1957), so zeigt sich, daß die Störung unmittelbar nach Zusatz des Toxins eintritt. Daraus läßt sich schließen, Fusarinsäure schädige am Gaswechsel beteiligte Fermente.

Bachmann (1956) mißt die Deplasmolysezeiten von *Rhoeo*-Protoplasten. 10^{-8} bis 10^{-5} molare Fusarinsäure erhöht die Wasserpermeabilität und vermindert sie 10^{-4} molar und höher, führt also in diesen Konzentrationen eine

Abdichtung der Plasmagrenzschicht herbei. Mit Natriumazid vorbehandelte Zellen vermögen in Gegenwart des Toxins nicht mehr abzudichten, während die Fähigkeit, bei niederen Konzentrationen die Wasserdurchlässigkeit zu erhöhen, bestehen bleibt. Umgekehrt reagieren mit 2,4-Dinitrophenol vorbehandelte Protoplasten auf Fusarinsäure von geringer Konzentration nicht mehr, während höhere Konzentrationen weiterhin eine Abdichtung verursachen. Blausäure beeinflußt die Toxinwirkung nicht.

Wie diese drei Gifte in den Stoffwechsel eingreifen, ist zum Teil noch unklar. Natriumazid und Blausäure hemmen schwermetallhaltige Enzyme, indem sie mit dem Metall einen Komplex bilden. Die Phosphorylierung wird durch Natriumazid und 2,4-Dinitrophenol beeinflußt (James 1953 a).

Japanische Forscher (Tamari und Kaji 1952, 1953, 1954) prüften einige nichtmetallhaltige und metallhaltige Enzyme und stellten fest, Fusarinsäure reagiere nur mit den metallhaltigen, vor allem mit Katalase und Peroxydase. Wie Deuel (1954) auf Grund theoretischer Überlegungen, so nehmen auch sie an, das Toxin wirke als Chelatbildner, binde die Schwermetalle und hemme so die entsprechenden Enzyme.

Aus den geschilderten Versuchen läßt sich die Arbeitshypothese ableiten, Fusarinsäure hemme zumindest in Konzentrationen über 10^{-4} Mol/Liter ein in die Atmungskette eingegliedertes Enzym. Keinesfalls darf aber daraus schon auf eine spezifische Wirkung gegenüber Cytochromoxydase geschlossen werden (Bachmann 1956; Gäumann 1958), denn Paquin und Waygood (1957) prüften den Einfluß des Toxins auf Cytochromoxydase in Tomatenmitochondrien. Es hemmt bei pH 7 erst 10^{-2} molar den Sauerstoffverbrauch um etwa 80 %. Auch das Bernsteinsäureoxydase-System wird gehemmt, die Bernsteinsäuredehydrogenase hingegen nicht. Mit abnehmender Toxinkonzentration nimmt die Wirkung rasch ab; so beträgt sie mit $5 \cdot 10^{-3}$ molarer Fusarinsäure noch 35 %, mit 10^{-3} molarer noch 17 %. Cytochrom c vermag die Hemmung aufzuheben. Die Autoren nehmen an, Fusarinsäure reagiere mit dem Cytochrom c. Doch bemerken sie dazu, daß die Atmung des Tomatenblattgewebes in vivo schon durch wesentlich kleinere Toxinmengen beeinflußt wird. Im Welketest sind die Tomatenpflanzen noch empfindlicher und sprechen somit wohl unabhängig vom Cytochrom an.

Vorerst soll nun abgeklärt werden, ob Fusarinsäure als Chelatbildner grundsätzlich schwermetallhaltige Enzyme hemmt und ob eine solche Inhibitorwirkung bei Konzentrationen zustande kommt, die in vivo denkbar sind.

I. KAPITEL

Methoden und Versuchsauswertung

1. Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Homogenisate (Potter und Elvehjem 1936) von jungen, im Gewächshaus gezogenen Tomaten der Sorte Tuckswood. Die Herstellung der verschiedenen Enzympräparate wird in den ent-

sprechenden Kapiteln beschrieben. Der Sauerstoffverbrauch beziehungsweise die O_2-Abgabe wurden manometrisch in der Warburg-Apparatur bestimmt (Umbreit, Burris und Stauffer 1949), mit Luft als Gasphase, einer Schüttelfrequenz von 125/Minute bei einem Ausschlag von 3 cm und einer Temperatur von 30 °C (beziehungsweise 20 °C bei den Katalaseversuchen). Die Prüfung der pH-Werte erfolgte mit Hilfe einer Glas-Kalomelelektrodenmeßkette, die Bestimmung der Lichtdurchlässigkeit im Zeiss Spektralphotometer.

Alle Versuche wurden mit synthetischer Fusarinsäure (Plattner, Keller und Boller 1954; Hardegger und Nikles 1957) durchgeführt, die in ihrer biologischen Aktivität der natürlichen Fusarinsäure entspricht (Gäumann, Naef-Roth und Kobel 1952). Die gewünschten pH-Werte wurden mit Natronlauge eingestellt.

Alle Enzympräparate konnten durch Kochen inaktiviert und durch Blausäure, die kupferhaltigen auch durch Na-Diäthyldithiocarbamat, gehemmt werden.

2. Versuchsauswertung

Um den Typus der Hemmung eines enzymatischen Vorganges zu bestimmen, geht man von den folgenden theoretischen Überlegungen aus. Zwischen Enzym und Präparat besteht das Gleichgewicht 1:

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P + Q \qquad (1)$$

(E = Enzym, S = Substrat, P und Q = Produkte)

Bei einer gegebenen Enzymmenge beeinflußt die Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit ($= v$). Für v läßt sich folgende Formel ableiten (Bladergroen 1955; Aebi 1956):

$$v = \frac{V\,(S)}{K_s + (S)} \qquad (2)$$

wobei V die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_s die Michaelis-Konstante bedeuten. Trägt man v auf der Ordinate und (S) auf der Abszisse ab, so ergibt sich zum Beispiel für die Polyphenoloxydaseaktivität der Tuckswood-Tomaten die graphische Darstellung der Abbildung 1 A.

Die Gleichung 2 läßt sich umformen in Gleichung 3:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V}\,\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V} \qquad (3)$$

In einem Koordinatensystem mit den reziproken Werten von v und (S) ergibt diese Gleichung eine Gerade (Abb. 1 B), deren Schnittpunkt mit der Ordinate gleich $\frac{1}{V}$ und mit der Abszisse gleich $-\frac{1}{K_s}$ ist.

Wirkt nun ein Hemmstoff I auf die Enzymreaktion ein, so gelten zusätzlich zum Gleichgewicht 1 noch folgende Gleichgewichte:

$E + I \rightleftharpoons EI$ für die kompetitive oder Verdrängungshemmung;
$ES + I \rightleftharpoons ESI$ für die unkompetitive Hemmung;
$E + I \rightleftharpoons EI,\ ES + I \rightleftharpoons ESI$ für die nicht-kompetitive Hemmung.

Dies ergibt für die drei Hemmungstypen folgende Formeln:

Kompetitive Hemmung: $$\frac{1}{v_i} = \frac{K_s}{V}\left[1 + \frac{(I)}{K_i}\right]\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V} \quad (4)$$

unkompetitive Hemmung: $$\frac{1}{v_i} = \frac{K_s}{V}\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V}\left[1 + \frac{(I)}{K_i}\right] \quad (5)$$

nicht-kompetitive Hemmung: $$\frac{1}{v_i} = \frac{K_s}{V}\left[1 + \frac{(I)}{K_i}\right]\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V}\left[1 + \frac{(I)}{K_i}\right] \quad (6)$$

(K_i = Dissoziationskonstante des Inhibitor-Enzym-Komplexes; v_i = Geschwindigkeit der gehemmten Reaktion.) In Abbildung 2 sind die den Formeln entsprechenden Geraden für das Koordinatensystem mit den reziproken Werten von v und (S) dargestellt (Lineweaver und Burk 1934).

Dixon (1953) schlägt die Darstellung in einem Koordinatensystem mit $1/v$ als Ordinate und der Inhibitorkonzentration (I) als Abszisse vor (Abb. 3), bei der sich für jede Substratkonzentration eine Gerade ergibt; die verschiedenen Geraden schneiden sich in einem Punkt, für den $y = 1/v$ und $x = -K_i$ ist. Diese Art der Darstellung eignet sich vor allem zur Bestimmung von K_i.

Aus diesen verschiedenen Kurvenbildern läßt sich erkennen, welcher Natur eine Hemmung ist und welcher Wert den Dissoziationskonstanten zukommt.

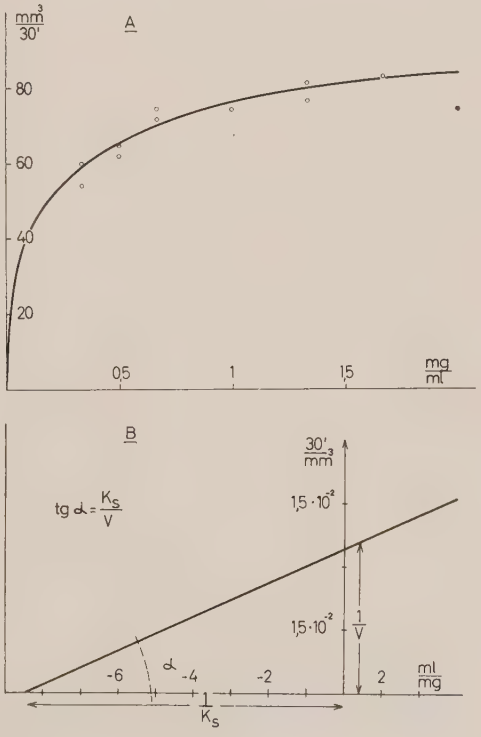
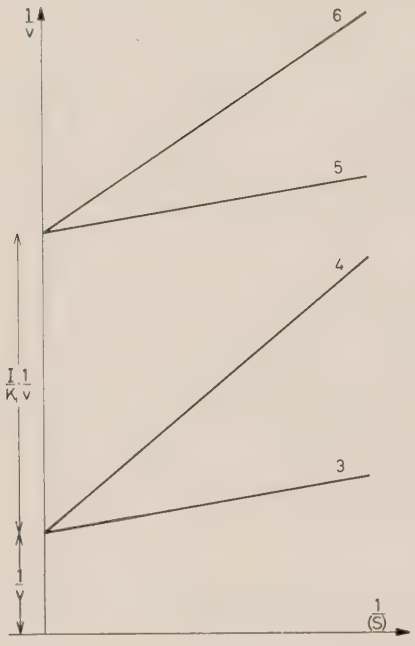


Abb. 1. Der Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Polyphenoloxydase. Graphische Darstellung der Gleichung 2 (Abb. 1 A) und der Gleichung 3 (Abb. 1 B nach Lineweaver und Burk 1934). (S) = Konzentration an p-Kresol in mg/ml; v = Polyphenoloxydase-Aktivität in mm³ verbrauchtem Sauerstoff während 30 Minuten

Um die Hemmung der Aktivität mit der nicht gehemmten Kontrolle zu vergleichen, wird im folgenden stets die prozentuale Hemmung angegeben. Dabei gilt:

$$h = (1 - \frac{v_i}{v}); \text{ Hemmungs-\%} = h \cdot 100 \qquad (7)$$



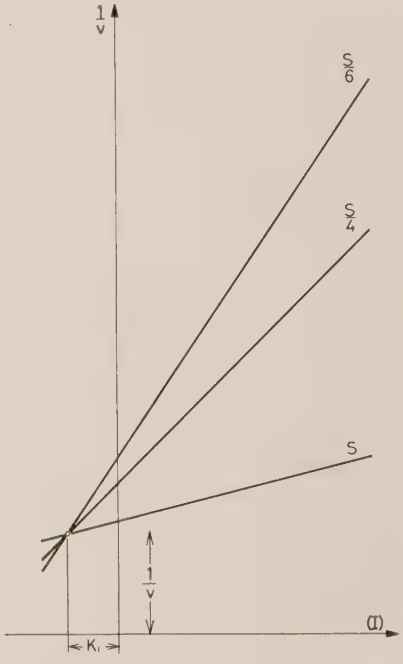


Abb. 2 (links). Graphische Darstellung einer enzymatischen Reaktion nach LINEWEAVER und BURK. Ohne Hemmung (Gleichung 3); kompetitive Hemmung (Gleichung 4); unkompetitive Hemmung (Gleichung 5); nicht-kompetitive Hemmung (Gleichung 6)

Abb. 3 (rechts). Graphische Darstellung einer kompetitiven Hemmung nach DIXON (1953) für drei Substratkonzentrationen (*S*). Ordinate: Reziproker Wert der Reaktionsgeschwindigkeit v. Abszisse: Inhibitorkonzentration

Für die kompetitive Hemmung kann man aus den Formeln 3, 4 und 7 folgende Beziehungen ableiten:

$$(I) \quad \frac{1-h}{h} = \frac{K_i}{K_s}(S) + K_i \qquad (8)$$

Daraus ist ersichtlich, daß das Ausmaß einer kompetitiven Hemmung zunimmt, je größer K_s sowie die Konzentration an Inhibitor oder je kleiner K_i sowie die Konzentration an Substrat sind.

II. KAPITEL

Tastversuche über die Wirkung der Fusarinsäure auf Katalase und Ascorbinsäureoxydase

1. Die Wirkung auf Tomatenkatalase

4 g frische Tomatenblätter wurden mit 100 ml 1/15 molarem Phosphatpuffer pH 7 (SÖRENSEN 1909) bei 4 °C homogenisiert und sodann mit einer Beschleunigung von etwa 20 000 g zentrifugiert. Die Katalase bleibt in Lösung. Die Präparate verlieren mit der Zeit ihre Aktivität und können nur frisch zubereitet verwendet werden. Die Konzentrationen bei einem Totalvolumen von 3 ml im Reaktionsgefäß betrugen: 0,15 ml Enzympräparat, 1/15 molarer Phosphatpuffer, 1 ‰ Wasserstoffperoxyd (bei Versuchsbeginn zugekippt). Bei einer konstanten Temperatur von 20 °C wurde gemessen, wieviel Sauerstoff bei der Spaltung des Peroxyds entsteht.

Während der ersten Viertelstunde nach Zusatz des Substrates ist die Sauerstoffabgabe bei konstantem pH-Wert annähernd konstant. Sie ist jedoch vom pH-Wert abhängig und beträgt bei pH 7,2 bis 6,6 120 mm^3/10 Minuten, bei pH 6,2 70 bis 80 mm^3/10 Minuten und bei pH 5,5 20 bis 30 mm^3/10 Minuten.

Setzt man Fusarinsäure zu, so ist nur bei Verwendung von sehr hohen Konzentrationen ein Einfluß auf die Sauerstoffabgabe festzustellen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Zeitspanne, während welcher das Toxin vor dem Zusatz des Wasserstoffperoxyds auf das Enzym einwirken kann. Normalerweise wurde die Fusarinsäure 3/4 bis 1/2 Stunde vor Versuchsbeginn zugegeben und hemmte 10^{-2} molar um 40 bis 50 %. Konnte das Toxin nur während 10 Minuten vor dem Wasserstoffperoxyd mit dem Enzym reagieren, so sank die Hemmung auf 20 %; beim Versuchsbeginn zugefügt, war die Wirkung des Toxins noch geringer. Unter den normalen Bedingungen — Zu-

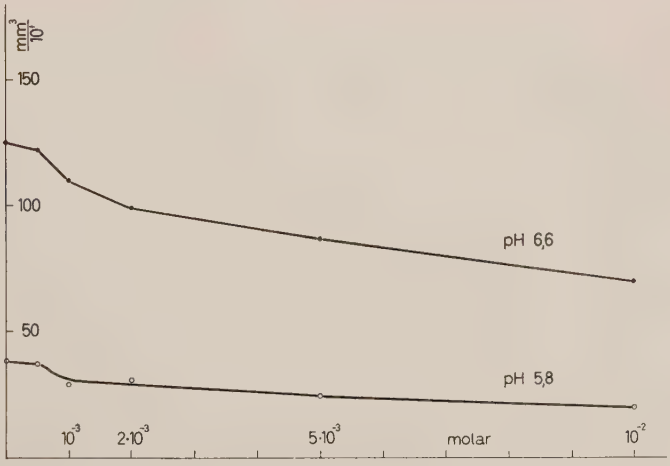


Abb. 4. Die Abnahme der Katalase-Aktivität mit zunehmender Fusarinsäurekonzentration bei pH 5,8 und pH 6,6. Ordinate: Sauerstoffabgabe in mm^3 während 10 Minuten. Abszisse: Fusarinsäurekonzentration in Mol/Liter

satz der Fusarinsäure zum Enzympräparat 3/4 Stunde vor dem Zukippen des Wasserstoffperoxyds — vermochte sie $5 \cdot 10^{-4}$ molar nicht mehr zu hemmen; $5 \cdot 10^{-3}$ molar sank die Aktivität um 30 % (Abb. 4) und selbst $2 \cdot 10^{-2}$ molar nur um 50 %.

2. Die Wirkung auf Pferdeleber-Katalase

Da das bisher verwendete Enzympräparat Verunreinigungen (unter anderem Schwermetalle) enthalten könnte, die sich mit Fusarinsäure verbinden und sie so der Wirkung auf das Ferment zu entziehen vermögen, wurde noch eine käufliche Katalase geprüft (Boehringer, Mannheim: Kat. I, Kristallsuspension, aus Pferdeleber isoliert). Die Versuchsanordnung war dieselbe; die Katalase wurde auf das 10^{-6}fache verdünnt.

Erstaunlicherweise zeigt sich hier unter dem Einfluß der Fusarinsäure keine Hemmung, sondern eine erhebliche Förderung der O_2-Abgabe, jedoch nur im neutralen Bereich bei pH 7, wo $5 \cdot 10^{-3}$ molare Fusarinsäure die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt und sie 10^{-2} molare gar verdreifacht. Bei pH 5 bis 6 steigert $5 \cdot 10^{-3}$ molare Säure nur um 15 %, 10^{-2} molare um 40 bis 60 %. Eine Hemmung tritt auch bei tiefem pH-Wert und hohen Toxinkonzentrationen nie auf.

Es ist schwierig, diese unterschiedliche Reaktionsweise der beiden, einerseits aus Tomate, andererseits aus Pferdeleber gewonnenen, Enzyme zu deuten: Da aber in beiden Fällen 10^{-3} molar das Toxin keinen wesentlichen Einfluß mehr ausübt, dürfte der Krankheitsverlauf in der Tomate kaum durch eine Katalasehemmung verursacht sein; sprechen doch alle bisher bekannten biologischen Tests auf das Toxin schon bei 10- bis 100mal geringeren Konzentrationen an. Auf nähere Untersuchungen konnte daher verzichtet werden.

3. Die Wirkung auf Ascorbinsäureoxydase

Versuchsanordnung

Geprüft wurde eine Suspension von Zellfragmenten aus Tomatenblättern, wobei das Blattmaterial (2 g Frischgewicht) in 20 ml isotonischer Saccharoselösung homogenisiert, mit einer Beschleunigung von etwa 15 000 g zentrifugiert, und der Rückstand wiederum in 20 ml Saccharoselösung suspendiert wurde. Im Mikroskop zeigte sich, daß keine ganzen Zellen mehr vorhanden waren. Das Totalvolumen im Warburg-Gefäß betrug 3,5 ml. Im Einsatz befanden sich 0,1 ml Filterpapier, 0,4 ml 20%ige Kalilauge, im Hauptraum 0,5 ml Wasser, 0,9 ml Zitronensäure-Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (McIlvaine 1921), 1,2 ml Zellfragmentsuspension sowie 0,4 ml 1%ige Ascorbinsäure. Der pH-Wert der Ascorbinsäure wurde mit Natronlauge eingestellt.

Das pH-Optimum der Enzympräparate liegt zwischen pH 5,9 und 6,3. Im sauren Bereich sinkt der Sauerstoffverbrauch rasch ab und beträgt bei pH 5 noch 1/3 des optimalen Wertes, während in neutralen Lösungen bei pH 7 der O_2-Verbrauch wiederum auf 2/3 absinkt.

Auch die Aktivität der Ascorbinsäureoxydase wird durch Fusarinsäure erniedrigt, und zwar ebenfalls in Abhängigkeit von der Zeitspanne, während welcher das Toxin schon vor dem Zusatz des Substrates auf das Enzym einwirkt (Abb. 5). So vermindert 10^{-2} molare Fusarinsäure vor allem nach der ersten Stunde die Aktivität um etwa 20 %; später ist die Abnahme geringer. Eine totale Inaktivierung tritt nie auf; selbst nach einer Einwirkungsdauer von 24 Sunden bleibt eine Restaktivität von 20 bis 30 % bestehen.

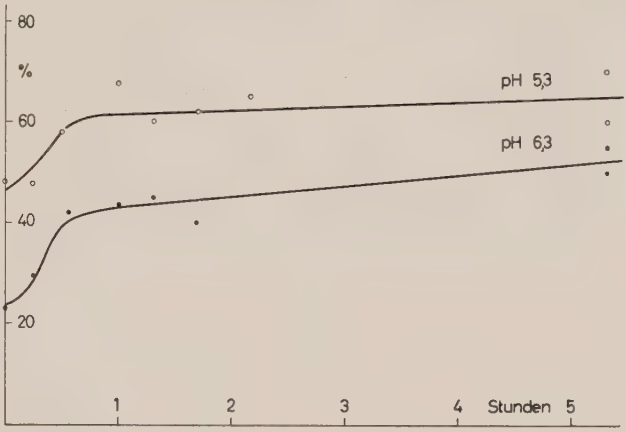


Abb. 5. Die Abhängigkeit der Ascorbinsäureoxydase-Aktivität von der Dauer der Vorbehandlung mit Fusarinsäure; (Einwirkung und Aktivitätsmessung bei pH 5,3 und pH 6,3; 10^{-2} molare Fusarinsäure). Ordinate: Abnahme des Sauerstoffverbrauchs in % der ungehemmten Kontrolle. Abszisse: Einwirkungsdauer vor Versuchsbeginn in Stunden

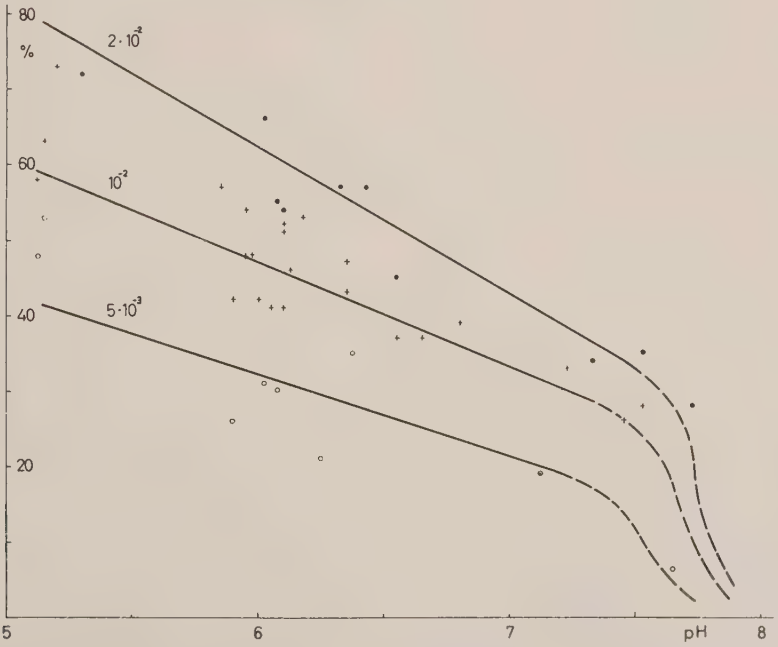


Abb. 6. Die Wirkung der Fusarinsäure auf die Ascorbinsäureoxydase-Aktivität bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen ($2 \cdot 10^{-2}$, 10^{-2}, $5 \cdot 10^{-3}$ molare Fusarinsäure). Ordinate: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in %. Abszisse: pH-Werte

Da eine so große Menge Enzympräparat nicht aus dem Anhang zugekippt und daher die Einwirkungszeit der Fusarinsäure auf das Enzym vor Versuchsbeginn nicht konstant gehalten werden konnte, ist die Streuung in Abbildung 6 groß. Unter den normalen Versuchsbedingungen beträgt die Zeitspanne zwischen der Zugabe der Fusarinsäure und dem Zukippen der Ascorbinsäure 30 bis 45 Minuten. Die eingezeichneten Kurven deuten einen möglichen Verlauf an. Dabei ist bei pH 8 keine Hemmung zu beobachten. Sie läßt sich erst bei tiefen pH-Werten feststellen; so beträgt sie bei pH 6 für 10^{-2} molare Fusarinsäure 40 bis 50 %. Auch die Aktivität der Ascorbinsäureoxydase läßt sich nur durch hohe Toxinkonzentrationen vermindern. 10^{-3} molare Fusarinsäure vermag selbst bei tiefem pH-Wert nicht mehr zu wirken.

Da beim Vorliegen einer kompetitiven Hemmung Substrat und Inhibitor um den Platz am Fermentmolekül konkurrieren, ist denkbar, daß bei geringer Ascorbinsäurekonzentration die Hemmung durch Fusarinsäure zunimmt. Wie Abbildung 7 zeigt, ist das jedoch nicht der Fall. Ob es sich unter den gegebenen Bedingungen (pH 5,9) um eine nicht kompetitive Hemmung der Ascorbinsäureoxydase handelt, wobei sich der Inhibitor sowohl mit dem Enzym allein wie mit dem Enzym-Substrat-Komplex verbindet, müßte noch durch weitere Versuche gesichert werden (vgl. Abb. 3).

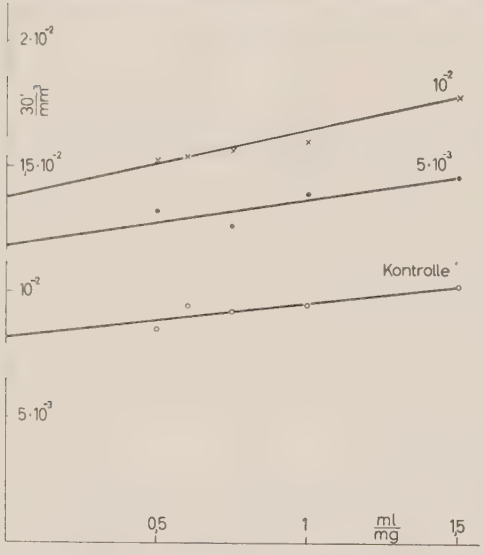


Abb. 7. Die Hemmung der Ascorbinsäureoxydase durch Fusarinsäure in der Darstellung nach Lineweaver und Burk.
Ungehemmte Kontrolle
$y = (1{,}36\,x + 8{,}17) \cdot 10^{-3}$
$5 \cdot 10^{-3}$ molare Fusarinsäure
$y = (1{,}85\,x + 11{,}81) \cdot 10^{-3}$
10^{-2} molare Fusarinsäure
$y = (2{,}53\,x + 13{,}77) \cdot 10^{-3}$

Jedenfalls steht fest, daß selbst unter optimalen Versuchsbedingungen die Aktivität der Ascorbinsäureoxydase nur durch unbiologische, in vivo gar nicht vorstellbare Fusarinsäuremengen (Gäumann und Loeffler 1957) vermindert werden kann.

Was schon Paquin und Waygood (1957) für die Cytochromoxydase feststellten, gilt auch für die ebenfalls eisenhaltige Katalase und für die kupferhaltige Ascorbinsäureoxydase; Fusarinsäure vermag wohl zu hemmen, jedoch nur in so hohen Konzentrationen, daß an einen Zusammenhang mit den durch das Toxin ausgelösten Krankheitssymptomen nicht gedacht werden kann.

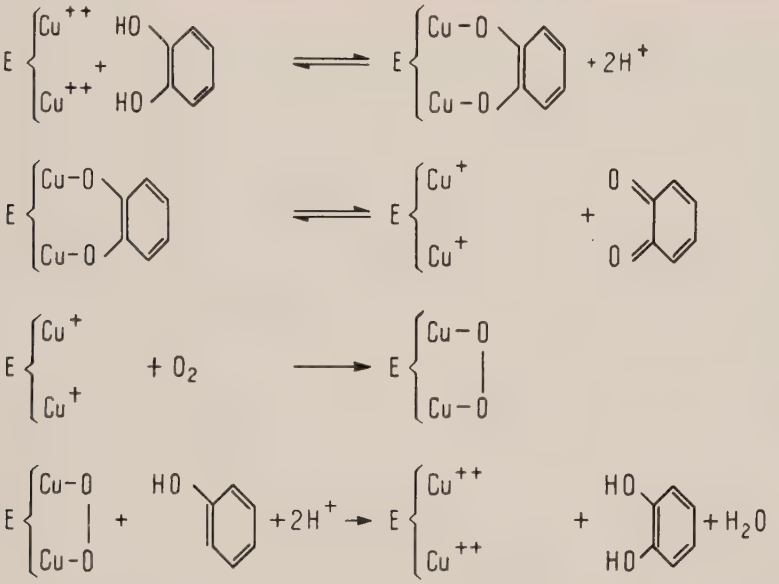
III. KAPITEL

Der Einfluß der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase

1. Reaktionsverlauf und Methoden

In der Literatur sind verschiedene aus Pflanzen isolierte Enzyme beschrieben, welche die Oxydation von Phenolen katalysieren (LARDY 1950; SCHWARZE 1958). Wieweit es sich dabei um identische Fermente handelt, ist noch umstritten.

Die Polyphenoloxydase oxydiert Monophenole zu o-Diphenolen und diese weiter zu den o-Chinonen. Damit aber die Oxydation der Monophenole einsetzt, muß eine geringe Menge o-Diphenol im System vorhanden sein. Für diese relativ unspezifischen Reaktionen, die durch dasselbe Enzym katalysiert werden (GREGG und NELSON 1940), nimmt MASON (1956) den folgenden Ablauf an:



Die Tatsache, daß zur Oxydation des Monophenols das Enzym in der reduzierten Form vorliegen muß, erklärt, weshalb die Reaktion, sofern nur sehr geringe Mengen an Diphenolen vorhanden sind, erst nach einer Induktionsperiode anläuft (KUBOWITZ 1937). Umgekehrt kann die Induktionsperiode durch kleine Gaben von Diphenolen verkürzt werden.

Da die Fermente nach ihren Substraten bezeichnet werden, erhält ein relativ unspezifisches Enzym oft mehrere Namen. So wird die Polyphenol-

oxydase auch Polyphenolase, Tyrosinase, Kresolase oder Katecholase genannt. Die letzten beiden Bezeichnungen werden häufig gebraucht, um die Aktivität gegenüber dem Monophenol von derjenigen gegenüber dem o-Diphenol zu unterscheiden.

Die Laccase vermag im Gegensatz zur Tyrosinase nur Diphenole und dabei sowohl ortho- wie para-Diphenole und Diamine wie p-Phenylendiamin zu oxydieren. In Patatен konnte eine Phenoloxydase festgestellt werden, die nur o-Diphenole oxydiert. Neufeld, Latterell, Green und Weintraub (1958) beschrieben eine Metapolyphenoloxydase, mit spezifischer Aktivität gegenüber meta-Diphenolen.

Diese Substratspezifität der verschiedenen Enzyme läßt sich nur an reinen Enzympräparaten eindeutig bestätigen. So vermag die Polyphenoloxydase selbst Ascorbinsäure zu dehydrieren, sofern geringe Mengen eines Diphenols (Katechol = Brenzkatechin) zugegen sind (Laroy 1950). Alle diese Phenoloxydasen enthalten Kupfer.

Zur Herstellung des Enzympräparates und zur Bestimmung seiner Aktivität dienen die folgenden Methoden: 50 g Tomatenwurzeln werden mit 150 ml eiskaltem Aceton im Turmix zerkleinert; der Rückstand wird abgenutscht und nachgespült, bis das Aceton farblos abfließt. Das gewonnene Pulver läßt man am Vakuum trocknen, bis es nicht mehr nach Aceton riecht, und gibt sodann 100 ml destilliertes Wasser zu. Die Suspension wird während einer Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt, wobei die Phenoloxydase wieder in Lösung geht; dann wird filtriert. Durch Lyophilisieren erhält man aus dem Filtrat ein leicht gelbliches Pulver. Dieses ist bei — 20 °C unbeschränkt haltbar; auch im wässerigen System läßt es sich längere Zeit bei dieser Temperatur ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahren. Sofern nichts anderes erwähnt ist, wurde stets die Kresolase-Aktivität ermittelt. Dabei befanden sich im Reaktionsgefäß bei einem Totalvolumen von 3 ml folgende Substanzen: 0,9 ml Zitronensäure-Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (McIlvaine 1921) und, je nach Versuchsanordnung, para-Kresol und Fusarinsäure. Um eine Inaktivierung des Enzyms durch das Toxin vor dem Versuchsbeginn auszuschließen, wurde das Enzympräparat aus dem Anhang zugekippt. Als Endprodukte der Reaktion entstehen durch Polymerisation der Chinone Pigmente (Mason 1955). Auch an der Verfärbung kann daher auf den Ablauf der Reaktion geschlossen werden. Dabei entspricht die Farbintensität dem gemessenen Sauerstoffverbrauch (siehe auch Abschnitt 4, Abb. 11).

Der unbeeinflußte Reaktionsverlauf ist in Abbildung 8 dargestellt. Dient p-Kresol als Substrat, so beginnt der Sauerstoffverbrauch erst nach einer Induktionsperiode (Kurve 2). Im Gegensatz dazu steigt er bei der Oxydation von Katechol sofort an (Kurve 1). Kleine Gaben von Katechol vermögen die Induktionsperiode bei der Oxydation des p-Kresols zu verkleinern (Kurve 3). Dies entspricht den Verhältnissen, wie wir sie für die Polyphenoloxydase dargelegt haben. Nach einiger Zeit hemmen Reaktionsprodukte die Aktivität; daher wird nie soviel Sauerstoff verbraucht, wie zur totalen

Oxydation des Substrates notwendig wäre. Die Reaktionsgeschwindigkeit soll während der Zeit des größten Sauerstoffverbrauchs gemessen werden, also im Zeit-Sauerstoff-Diagramm (Abb. 8, Kurve 2) im Bereich des Wendepunktes während 30 Minuten, da innerhalb dieser Zeitspanne der Verbrauch annähernd konstant bleibt.

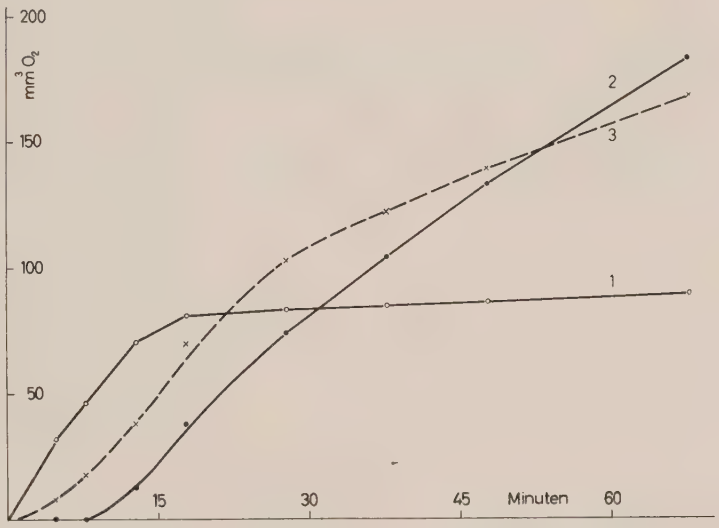


Abb. 8. Die Katecholase- und Kresolase-Aktivität der Tomatenphenoloxydase. 1. 1 ‰ Katechol (Brenzkatechin); 0,6 ml Enzympräparat; 2. 1 ‰ p-Kresol; 0,2 ml Enzympräparat; 3. 1 ‰ p-Kresol; 0,1 ‰ Katechol; 0,2 ml Enzympräparat (Totalvolumen 3 ml). Ordinate: Sauerstoffverbrauch in mm³. Abszisse: Zeit nach Zusatz des Substrates in Minuten

Die Phenoloxydasepräparate aus Tomatenwurzeln zeigen einen Sauerstoffquotienten Q_{O_2} (Umbreit, Burris und Stauffer 1949) von 380 bis 460 mm³/mg Std. Durch Erhitzen auf 100 °C während 10 Minuten büßen sie ihre Wirksamkeit ein. Das pH-Optimum liegt bei pH 7.

2. Der Hemmungstypus der Fusarinsäure

Fusarinsäure hemmt schon in niederen Konzentrationen die Oxydation des p-Kresols. Um festzustellen, wie sie am Enzym angreift, variiert man die Substratmenge gegenüber der Toxinkonzentration. Zu Beginn des Versuches befanden sich im Reaktionsgefäß: das Enzympräparat, Phosphat-Citrat-Puffer pH 7, 1/3 bis 4 ‰ p-Kresol und Fusarinsäure ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$ molar, 10^{-4} molar oder Wasser in der Kontrolle). Mit zunehmender Substratmenge nahm die Hemmung ab. Die Auswertung der Resultate erfolgte an Hand einer graphischen Darstellung (siehe Kapitel I), wobei auf der Ordinate die reziproken Werte des Sauerstoffverbrauches je Zeiteinheit, auf der Abszisse die reziproken Werte der Substratkonzentration aufgezeichnet wur-

den (Lineweaver und Burk 1934). Die Gleichungen und die Korrelationskoeffizienten r der drei Punktescharen wurden nach Linder (1951) berechnet.

Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich ist, schneiden sich die drei Geraden annähernd auf der Ordinate. Jeder Geraden kommt eine bestimmte Toxinkonzentration zu; der untersten entspricht die ungehemmte Reaktion. Für die Geraden gilt die Gleichung 4:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V}\left[1 + \frac{(I)}{K_i}\right]\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V}$$

Es handelt sich daher um eine kompetitive oder Verdrängungshemmung: Das Substrat und die Fusarinsäure konkurrieren um den Platz am Enzymmolekül.

Da die Steigung der Geraden, die der ungehemmten Reaktion zukommt, sehr gering (K_s/V = 1,34) und zudem der Korrelationskoeffizient klein ist, läßt sich die Michaelis-Konstante K_s nur ungenau bestimmen. In diesem Versuch dürfte K_s (1,09 ± 0,26) · 10^{-3} Mol/Liter betragen. Für die Dissoziationskonstante K_i des Fusarinsäure - Phenoloxydase - Komplexes ergibt sich ein Wert von 4 bis 5 · 10^{-5} Mol/Liter.

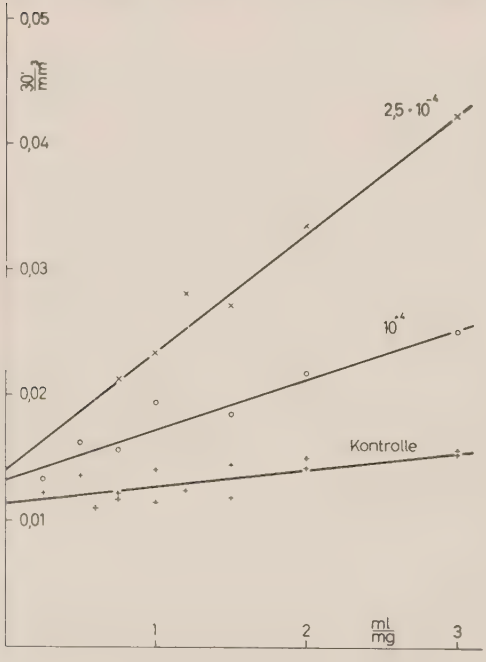


Abb. 9. Die kompetitive Hemmung der Kresolase-Aktivität durch Fusarinsäure in der Darstellung nach Lineweaver und Burk (pH 7).
Ungehemmte Kontrolle
$y = (1{,}34\,x + 11{,}38) \cdot 10^{-3}$ $r = 0{,}765$
10^{-4} molare Fusarinsäure
$y = (3{,}97\,x + 13{,}35) \cdot 10^{-3}$ $r = 0{,}961$
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäure
$y = (9{,}51\,x + 13{,}99) \cdot 10^{-3}$ $r = 0{,}987$

3. Die pH-Abhängigkeit der Hemmung

Das Ausmaß der Hemmung hängt einerseits von der Substratkonzentration ab; andererseits aber läßt sich auch ein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration feststellen. Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, daß der Einfluß der Fusarinsäure vom sauren gegen den neutralen Bereich hin abnimmt. Vergleicht man die Werte der Kontrolle mit dem gehemmten Sauerstoffverbrauch, so wird die Abnahme der Hemmung der Kresolase-Aktivität gegen pH 7 hin sehr deutlich.

In Tabelle 1 sind die Resultate für die Hemmung durch Fusarinsäure bei einigen pH-Werten zusammengestellt. Auf die in der Tabelle aufgeführten berechneten Werte wird später noch eingegangen.

Während bei pH 7,4 $5 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäure die Phenoloxydase um 27 % hemmt, so führt bei pH 6,6 schon eine um das Fünffache kleinere Toxinmenge zu demselben Effekt.

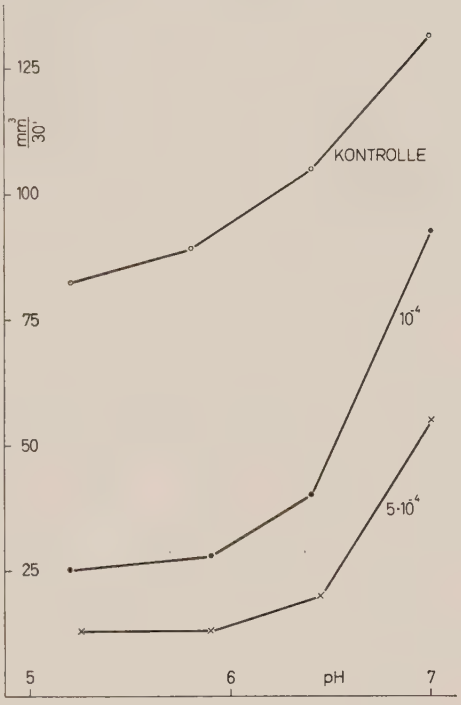


Abb. 10. Die pH-Abhängigkeit der ungehemmten und der durch Fusarinsäure gehemmten Kresolase-Aktivität ($5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} molare Fusarinsäure bzw. Wasser in der Kontrolle; 1 ‰ p-Kresol). Ordinate: Sauerstoffverbrauch in mm^3 während 30 Minuten. Abszisse: pH-Werte

Tabelle 1

Die Hemmung der Kresolase-Aktivität durch Fusarinsäure bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Vergleich eines Versuchsbeispieles mit den theoretischen Werten (10^{-2} molares p-Kresol, Hemmung des Sauerstoffverbrauches in %)

pH	Fusarinsäure Mol/Liter					
	$5 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
	gemessene Werte			errechnete Werte		
5,6	87	80	61	86,5	76,5	57
5,9	86	77,5	43	81	68,5	47,5
6,6	76,5	56	26	68	51	29,5
7,4	27	17,5	13	23,5	18,5	6

4. Der Hemmungsbereich der Fusarinsäure

Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, in welchem Konzentrationsbereich Fusarinsäure die Polyphenoloxydase hemmt. Da beim pH-Optimum der Enzymaktivität (pH 7) die Hemmung durch Fusarinsäure wesentlich geringer ist als in sauren Lösungen, wurde der Hemmungsbereich bei einem etwas tieferen pH-Wert bestimmt. Aus methodischen Gründen — die Aktivität unter pH 5,5 ist gering und streut stark — wurde dafür ein Milieu von

pH 5,8 bis 6 gewählt. Vorerst mußte jedoch festgestellt werden, ob auch bei tiefem pH eine kompetitive Hemmung vorliegt. Tabelle 2 zeigt an einem Beispiel, wie bei pH 6 mit abnehmender Substratkonzentration die Hemmung zunimmt. Es handelt sich auch bei tiefem pH um eine kompetitive Hemmung der Phenoloxydase durch die Fusarinsäure. Die unten in Tabelle 2 angeführten berechneten Werte sollen später besprochen werden.

Tabelle 2

Die kompetitive Hemmung der Kresolase-Aktivität durch Fusarinsäure bei pH 6.

Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Werten (Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in %, Konzentrationen in Mol/Liter)

Fusarinsäure	p-Kresol				
	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	
10^{-4}	53	40	41		gemessene Werte
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	70	57	55	46	
$5 \cdot 10^{-4}$		79	68	61,5	
10^{-4}	51	44	34,5	24	berechnete Werte
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	72	65,5	55,5	44	
$5 \cdot 10^{-4}$	84	79	71	61	

Um die Hemmung der Oxydation des p-Kresols durch die Phenoloxydase in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration festzustellen, wurden zu einer auf pH 5,8 gepufferten 1‰igen p-Kresollösung verschiedene Mengen Fusarinsäure zugesetzt, und zwar so, daß die Endkonzentrationen 10^{-6} bis 10^{-2} Mol/Liter betrugen. Aus den Ergebnissen (Abb. 11) geht hervor, daß die Fusarinsäure die Phenoloxydase 10^{-5} molar um 27 %, 10^{-4} molar schon um 61 % und $5 \cdot 10^{-3}$ molar fast gänzlich hemmt.

Noch besser kommen diese Verhältnisse in Abbildung 12 zum Ausdruck, wo die Hemmung (Mittel aus 2 bis 4 Versuchen) gegenüber dem Logarithmus der Toxinkonzentration aufgetragen ist. Über 10^{-6} molar vermag Fusarinsäure das Enzym zu hemmen. Eine 50%ige Hemmung tritt bei Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-5}$ molar ein und 10^{-2} molar beträgt sie 100 %.

Als Folge der Oxydation des p-Kresols entstehen Farbstoffe. Um beurteilen zu können, wie weit deren Bildung mit der Oxydation parallel geht, wurde nach Abschluß des in Abbildung 11 dargestellten Versuchs die Extinktion der Reaktionslösungen bei 575 mμ gemessen. Die Resultate stehen neben den entsprechenden Kurven der Abbildung 11. Die Extinktion nimmt proportional zur Hemmung ab. Als Folge der Blockierung des Primärvorganges — der enzymatischen Oxydation des p-Kresols — wird die Bildung der Endprodukte der Reaktionskette unterbunden; die Pigmentbildung unterbleibt. Die Wirkung der Fusarinsäure läßt sich daher auch am Ausbleiben einer Verfärbung feststellen.

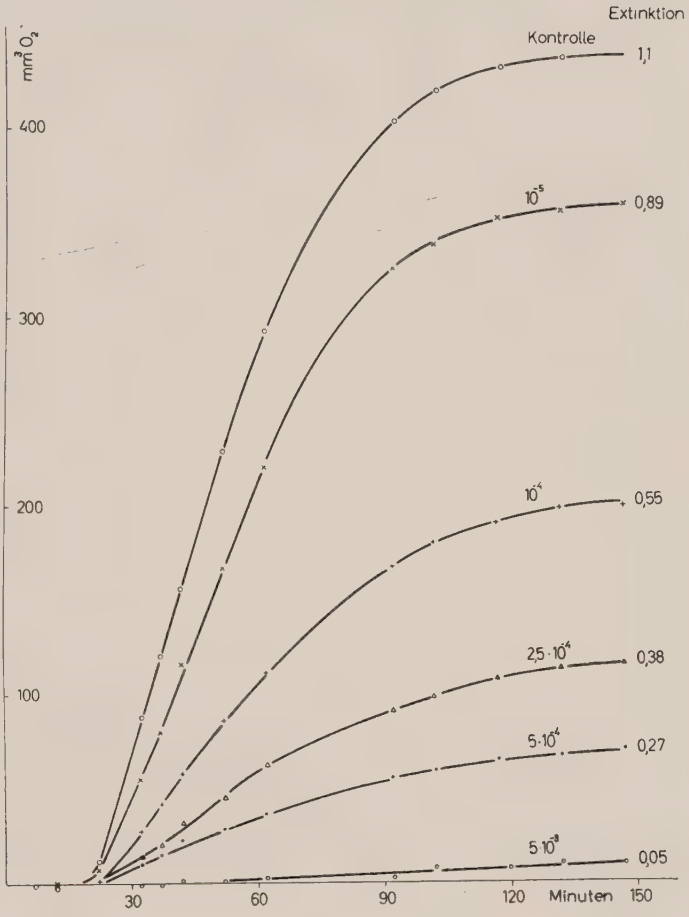


Abb. 11. Die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und der Pigmentbildung mit steigenden Fusarinsäurekonzentrationen bei der enzymatischen Oxydation des Kresols (1 ‰ p-Kresol; pH 5,8: $5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $2{,}5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4}, 10^{-5} molare Fusarinsäure; Extinktion der Reaktionslösungen am Schluß des Versuchs bei 575 mμ bestimmt). Ordinate: Sauerstoffverbrauch in mm^3. Abszisse: Zeit nach Zusatz des Enzyms in Minuten

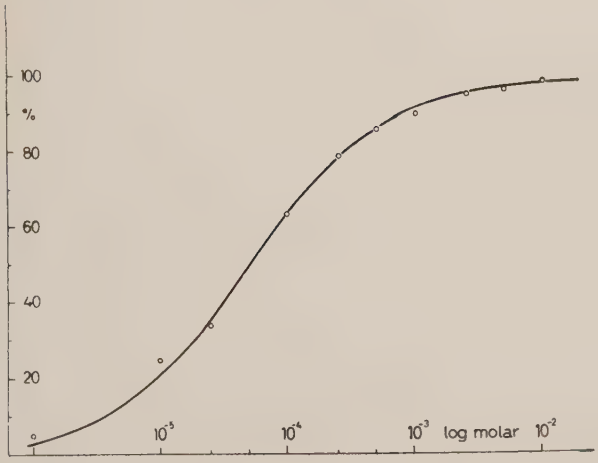


Abb. 12. Die Hemmung der Kresolase-Aktivität durch Fusarinsäure verschiedener Konzentrationen (1 ‰ p-Kresol; pH 5,8; Mittel aus zwei bis vier Versuchen). Ordinate: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in %. Abszisse: Logarithmus der Fusarinsäurekonzentration

5. Zusammenhänge zwischen Wasserstoffionen-, Substrat- und Inhibitorkonzentrationen bei der Hemmung der Phenoloxydase durch Fusarinsäure

Fusarinsäure hemmt erstens kompetitiv, also abhängig von der Substratkonzentration, und zweitens um so stärker, je tiefer der pH-Wert, oder anders ausgedrückt, je größer die Wasserstoffionenkonzentration gehalten wird. Aus der Formel 8 (Kapitel I) haben wir für die kompetitive Hemmung abgeleitet, daß sie zunimmt, je größer K_s oder je kleiner K_i wird. Vergrößert sich K_s, so verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, erreicht die Aktivität der Enzympräparate gegen pH 7 ihren optimalen Wert. Nun bleibt abzuklären, ob die Zunahme der Hemmung bei tiefem pH von einer Erhöhung der Michaelis-Konstante abzuleiten ist oder ob sich auch K_i ändert.

Die Hemmung h bei gegebener Substrat- und Inhibitorkonzentration (S) und (I) ist bekannt. Berechnet man den Wert für (I) $1 - h$ und trägt ihn gegenüber (S) auf, so ergibt sich eine Gerade. Ihre Steigung ist gleich dem Verhältnis K_i/K_s, der Abschnitt auf der Ordinate gleich K_i und der Abschnitt auf der Abszisse gleich $-K_s$. In Abbildung 13 sind die Geraden für einige pH-Werte aufgezeichnet; bei einzelnen Punkten ist zudem die mittlere quadratische Abweichung s (Linder 1951) angegeben, die jeweils aus 5 bis 16 Versuchen errechnet wurde. s ist ziemlich groß, da von Versuch zu Versuch die Hemmung um $\pm$ 10 % streute. Aus diesem Grunde sind in Tabelle 1 und 2 einzelne Versuche dargestellt und nicht die Mittelwerte ganzer Versuchsserien. Aus Abbildung 13 läßt sich eindeutig ablesen, daß sich das Verhältnis K_i/K_s je nach dem pH-Wert der geprüften Lösungen ändert. K_s steigt von $3{,}8 \cdot 10^{-3}$ bei pH 7 auf $1{,}4 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter bei pH 5,6. Doch bleibt auch K_i nicht konstant; sie sinkt von $8{,}5 \cdot 10^{-5}$ bei pH 7 auf $4{,}7 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter bei pH 5,6.

In Abbildung 14 sind die negativen Logarithmen (pK) der Dissoziationskonstante K_i und der Michaelis-Konstante K_s für verschiedene pH-Werte dargestellt. Die Konstanten K_s und K_i lassen sich einerseits mit Hilfe der graphischen Darstellungen nach Lineweaver und Burk (1934) und nach Dixon (1953), andererseits an Hand der Abbildung 13 ermitteln. Im ersten Fall handelt es sich um Resultate aus einzelnen Versuchen; in Abbildung 14 sind sie als Punkte eingezeichnet. Die Kurven folgen Werten, die aus Abbildung 13 abgelesen sind. Sie liegen um das Fünffache höher als die Punkte. Sie entsprechen aber den Punkten insofern, als die Abnahme von K_i und die Zunahme von K_s bei höherer Wasserstoffionenkonzentration von derselben Größenordnung sind und somit das Verhältnis K_i zu K_s für konstante pH-Werte gleich groß ist.

Als Basis für die folgenden Berechnungen dienten die Geraden der Abbildung 13 beziehungsweise die aus ihrem Verlauf abgelesenen Werte für die Konstanten K_s und K_i (Kurven in Abb. 14). Sie beruhen auf Mittelwerten vieler Versuchsserien. Für einen konstanten pH-Wert lassen sich K_s und K_i

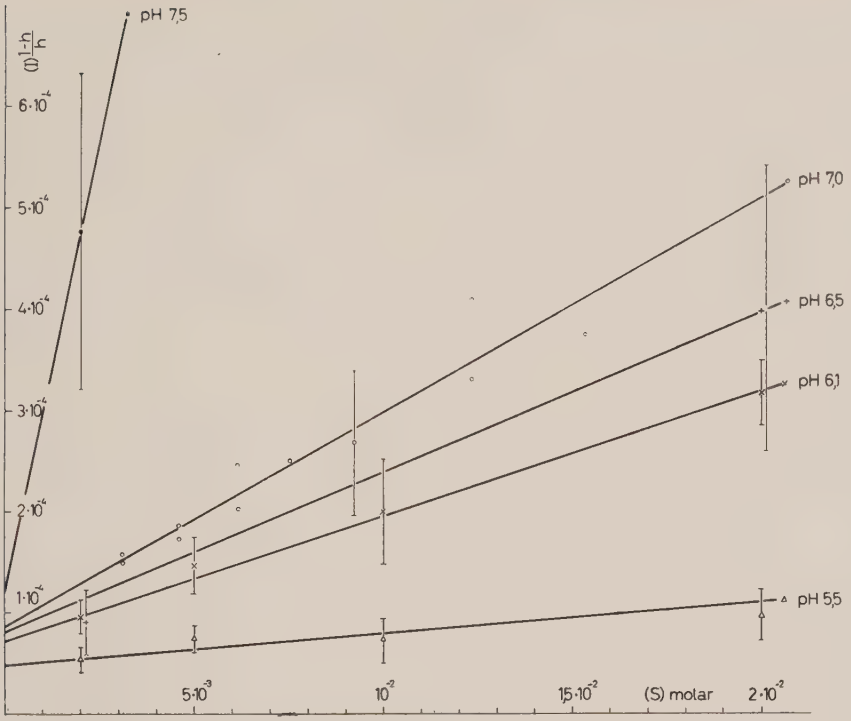


Abb. 13. Die Hemmung der Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure in Abhängigkeit der p-Kresol- und Wasserstoffionenkonzentration. Graphische Darstellung der Gleichung

$$(\mathrm{I})\quad \frac{1-h}{h} = \frac{K_i}{K_s}(S) + K_i$$

(I) = Fusarinsäure-, (S) = Substratkonzentration in Mol/Liter, h = Hemmung, K_i und K_s = Inhibitor- und Michaelis-Konstante. Ordinate: (I) $\frac{1-h}{h}$ Abszisse: Konzentration des p-Kresols in Mol/Liter.

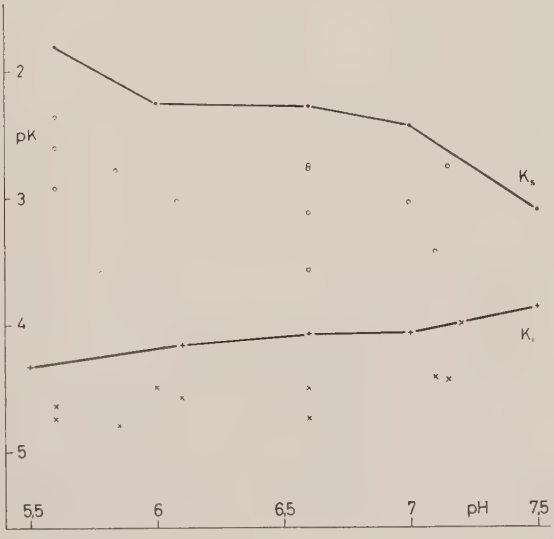


Abb. 14. Die pH-Abhängigkeit der Michaelis-Konstante K_s des p-Kresol - Polyphenoloxydase - Komplexes und der Dissoziationskonstante K_i des Fusarinsäure-Polyphenoloxydase-Komplexes. Ordinate: negativer Logarithmus der Konstanten (pK). Abszisse: pH-Werte. Erklärung im Text

bestimmen; kennt man zusätzlich die p-Kresol- und Fusarinsäurekonzentration, so läßt sich die Hemmung der Polyphenoloxydase berechnen. Da wir von Mittelwerten ausgegangen sind, handelt es sich bei den Resultaten wiederum um mittlere Werte. In den Tabellen 1 und 2 sind diese berechneten mittleren Werte für die Phenoloxydasehemmung durch Fusarinsäure neben den direkt gemessenen Versuchsergebnissen aufgeführt. Die gemessenen Werte weichen um etwa ± 10 % von den berechneten ab, was der Streuung von Versuch zu Versuch entspricht. Unsere Annahme, die Fusarinsäure hemme kompetitiv und pH-abhängig, wobei mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration K_s ansteigt und K_i abnimmt, besteht daher zu Recht.

Reusser und Naef-Roth (1956) stellten an Hefe fest, daß die Fusarinsäure nur im undissoziierten Zustand, also bei tiefen pH-Werten, von der Zelle aufgenommen wird. Das Toxin hemmt die O_2-Aufnahme wie die CO_2-Abgabe in sauren Lösungen stärker als in neutralem Milieu. Daneben machten die Autoren aber Beobachtungen, die sich nicht allein mit dem unterschiedlichen Eindringungsvermögen der Fusarinsäure in die Zelle erklären lassen. So kann durch Erhöhen des pH-Wertes die Hemmung der Atmung sofort aufgehoben werden. Die Schädigung der Hefezelle durch nicht dissoziierte Fusarinsäure ist also in den ersten zwei bis drei Stunden der Einwirkung reversibel. Zerstört man die Plasmamembran der Zellen durch Lyophilisieren, so bleibt die Hemmungswirkung noch teilweise pH-abhängig und reversibel. Die Fusarinsäure, die bei tiefem pH von der Zelle aufgenommen wurde, verliert bei hohem pH rasch ihre Toxizität. Es lassen sich dafür zwei Erklärungen geben: 1. Das Toxin wird rasch abgebaut oder durch einen anderen Mechanismus entgiftet, oder es hat 2. im neutralen Bereich keine genügende Wirkungsmöglichkeit mehr. Wie wir gesehen haben, trifft die zweite Annahme für die Phenoloxydase zu, wird sie doch in neutralem Milieu durch Fusarinsäure nur sehr schwach gehemmt.

6. Die Hemmung durch Fusarinsäure bei Verwendung verschiedener Substrate

Im weiteren stellen sich zwei Fragen: 1. Um welche Phenoloxydase handelt es sich bei unserem Enzympräparat? 2. Vermag Fusarinsäure auch zu hemmen, falls statt p-Kresol andere Substrate verwendet werden? Wie wir gesehen haben, hängt die Hemmung stark von der Größe der Michaelis-Konstante ab, und diese nimmt je nach Substrat andere Werte an. Falls für einen Substrat-Enzym-Komplex die Konstante K_s sehr klein wird, bleibt die Hemmung aus.

In einem qualitativen Test wurden verschiedene Phenole als Substrate dem Phenoloxydasepräparat beigegeben. Die Konzentrationsverhältnisse bei einem Totalvolumen von 2 ml waren die folgenden: 0,5 ml Phosphat-Citratpuffer pH 5,8; 0,5 ‰ Substrat; 10^{-3} molare Fusarinsäure beziehungsweise Wasser bei den Kontrollen. Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur

Tabelle 3

Die Farbstoffbildung durch Tomaten-Polyphenoloxydase in Phenollösungen

(10^{-3} molare Fusarinsäure; pH 5,8; Auswertung nach 3½ und 19 Stunden; ++ stark verfärbt, + verfärbt, ∓ schwach verfärbt, — nicht verfärbt)

Substrat, 0,5 %		ungehemmt		durch Fusarinsäure gehemmt	
		3½ Std.	19 Std.	3½ Std.	19 Std.
Monophenole	Phenol	—	∓	—	—
	p-Kresol	++	++	—	∓
	Tyrosin	∓	++	—	—
o-Diphenole	Katechol (Brenzkatechin)	++	++	+	+
	3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa)	++	++	—	—
	Protokatechusäure	—	∓	—	—
	Kaffeesäure	++	++	—	∓
	Chlorogensäure	++	++	—	—
p-Diphenol	Hydrochinon	—	—	—	—
Triphenol	Phloroglucin	—	—	—	—

stehengelassen und die Verfärbung nach 3½ und 19 Stunden abgeschätzt (Tab. 3).

Die Oxydation sowohl von Monophenolen wie von o-Diphenolen wird durch das verwendete Enzympräparat katalysiert, wobei für Monophenole die Induktionsperiode gut festzustellen ist. Hydrochinon reagiert ebenfalls, wenn auch sehr schwach. Der Typus des Fermentes ist mit unreinen Präparaten schwer festzulegen, da die Anwesenheit von geringen Mengen Katechol die Oxydation weiterer Substrate, zum Beispiel von Ascorbinsäure (LARDY 1950), erlaubt. Für die Tatsache, daß es sich in unserem Falle um die Polyphenoloxydase (Tyrosinase) handelt, spricht die Oxydation von Monophenolen, die erst nach einer Induktionsperiode anläuft. Im 8. Abschnitt wird nochmals auf diese Frage eingegangen.

Deutlich läßt sich bei allen verwendeten Mono- und Diphenolen die Hemmung durch Fusarinsäure erkennen. Am kleinsten ist sie beim Katechol, was darauf zurückzuführen ist, daß dieses Diphenol wesentlich schneller mit dem Enzym zu reagieren vermag; die Michaelis-Konstante ist klein.

Wie im weiteren eine quantitative Bestimmung zeigt, wird auch die Oxydation der o-Diphenole durch Fusarinsäure kompetitiv gehemmt (Abb. 15). Statt p-Kresol wurde 1 ‰ 3,4-Dioxyphenylalanin verwendet sowie $5 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäure bei pH 7,1. Die Geraden $y = (3{,}49\,x + 5{,}62) \cdot 10^{-3}$ (ungehemmt) und $y = (11{,}72\,x + 4{,}86) \cdot 10^{-3}$ (gehemmt) schneiden sich annähernd auf der Ordinate, was darauf schließen läßt, daß es sich um eine kompetitive Hemmung handelt.

Die Werte für die Konstanten betragen: $K_s = 3{,}2 \cdot 10^{-3}$; $K_i = 1{,}3 \cdot 10^{-4}$. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitorkomplexes ist für

ein bestimmtes pH gegeben. Unterschiede in der Hemmung hängen allein von den verschiedenen Michaeliskonstanten der einzelnen Substrat-Enzymkomplexe ab, was das Experiment bestätigt; denn K_i ist von derselben Größenordnung wie die in Abbildung 14 dargestellte Konstante.

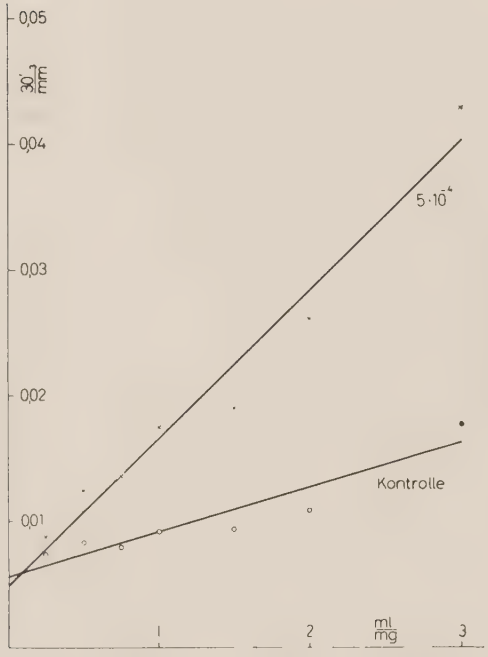


Abb. 15. Die kompetitive Hemmung der enzymatischen Oxydation des 3,4-Dioxyphenylalanins (Dopa) durch $5 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäure in der Darstellung nach LINEWEAVER und BURK; (1 ‰ Dopa; pH 7,1).
Ungehemmte Kontrolle
$y = (3{,}49\,x + 5{,}62) \cdot 10^{-3}$
$r = 0{,}937$
$5 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäure
$y = (11{,}72\,x + 4{,}86) \cdot 10^{-3}$
$r = 0{,}981$

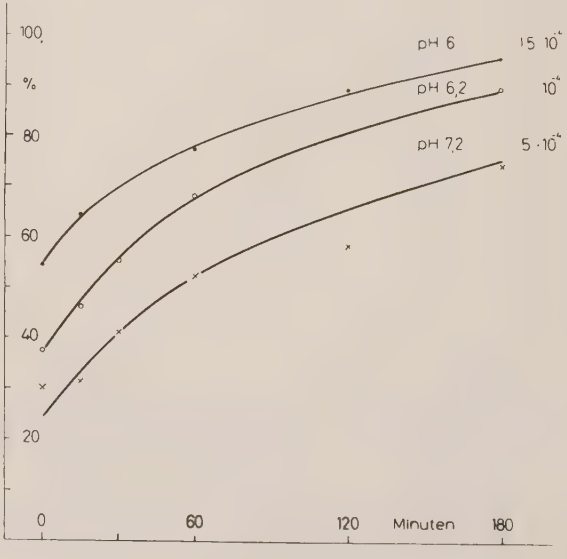


Abb. 16. Die Inaktivierung der Polyphenoloxydase in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Fusarinsäure
Ordinate: Verminderung des Sauerstoffverbrauches gegenüber der Kontrolle in %.
Abszisse: Einwirkungsdauer vor Versuchsbeginn in Minuten.
($1{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol. Fusarinsäure, pH 6;
10^{-4} mol. Fusarinsäure, pH 7;
$5 \cdot 10^{-4}$ mol. Fusarinsäure, pH 7,2)

7. Die Inaktivierung der Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure

Läßt man die Fusarinsäure in Abwesenheit eines Substrates auf das Enzym einwirken, so nimmt die Aktivität mit zunehmender Einwirkungsdauer rasch ab, wie aus Abbildung 16 hervorgeht. In den diesbezüglichen Versuchen wurde das Ferment gleichzeitig mit der Fusarinsäure ins Reaktionsgefäß gegeben und das Substrat nach 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten aus dem Anhang zugekippt. Die Fusarinsäure- und die Wasserstoffionenkonzentration wurden variiert, um die Anfangsbedingungen für eine Inaktivierung unterschiedlich zu gestalten. Die drei Kurven der Abbildung 16 entsprechen solchen verschiedenen Versuchsanordnungen.

Nach einer Einwirkungszeit von drei Stunden vermindert sich die Aktivität um 40 bis 45 %. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme scheint unabhängig von der Toxin- und Wasserstoffionenkonzentration zu sein; das Ausmaß der Inaktivierung nach einer bestimmten Zeit hingegen geht parallel zur Hemmung. In unseren Versuchen wird der Sauerstoffverbrauch stets ungefähr 15 Minuten nach Versuchsbeginn während 30 Minuten bestimmt. Also spielt die Inaktivierung bereits eine Rolle, was bei den Resultaten in Abbildung 16 zu berücksichtigen ist.

Wir können uns die Wirkungsweise der Fusarinsäure gegenüber der Polyphenoloxydase folgendermaßen vorstellen: Vorerst tendieren sowohl das Substrat wie das Toxin danach, an die aktive Gruppe (prosthetische Gruppe) des Enzyms heranzutreten. Die Fusarinsäure verbindet sich leichter mit dem Fermentmolekül als das Substrat ($K_i/K_s > 1$) und das Verhältnis dieser Bindungskräfte ändert sich bei zunehmender Wasserstoffionenkonzentration zugunsten der Fusarinsäure (K_i/K_s wird kleiner). Sobald die Anlagerung des Toxins ans Enzym vollzogen ist, setzt eine Zerstörung des Fermentmoleküls ein; es büßt an Aktivität ein. Diese Inaktivierung nimmt mit der Zeit zu, weil die Fusarinsäure stets wieder vom geschädigten Molekül wegdissoziiert und neue, noch intakte prosthetische Gruppen angreift. Daß diese Annahme stimmt, zeigt Tabelle 4. Senkt man die Wasserstoffionenkonzentration, sofern noch aktive Polyphenoloxydase vorhanden ist, so vermindert sich die Hemmung im entsprechenden Ausmaße. Versucht man dasselbe jedoch erst, nachdem die Fusarinsäure zwei

Tabelle 4

Die pH-Reversibilität der Hemmung und die Irreversibilität der Inaktivierung von Polyphenoloxydase, welcher Fusarinsäure zugesetzt wurde

(10^{-4} molare Fusarinsäure; 10^{-2} molares p-Kresol; pH 6,2 durch $^1/_{100}$ normale NaOH bei Versuchsbeginn auf pH 6,8 eingestellt. Abnahme der Aktivität in % der Kontrollen)

Fusarinsäure-Zusatz	pH 6,2	+ NaOH → pH 6,8
bei Versuchsbeginn (Hemmung)	54 %	36 %
2 Std. vor Versuchsbeginn (Inaktivierung)	91 %	90 %

Stunden lang das Enzym inaktivieren konnte, so läßt sich die Aktivität nicht mehr erhöhen. Die Inaktivierung ist also irreversibel. Worauf die Schädigung des Enzyms durch das Toxin zurückzuführen ist, konnte nicht festgestellt werden. Möglicherweise entzieht die Fusarinsäure dem Ferment das Kupfer. Eine Überprüfung dieser Möglichkeit bietet jedoch vorerst noch große experimentelle Schwierigkeiten.

8. Die Wirkung der Fusarinsäure auf Pilz-Polyphenoloxydase

Bei allen Experimenten mit rohen Enzympräparaten besteht die Ungewißheit, wie weit der Effekt durch allfällige Verunreinigungen verfälscht wird. Zum Vergleich mit der selbstgewonnenen Tomaten-Polyphenoloxydase wurde daher der Einfluß der Fusarinsäure auf ein reineres Polyphenoloxydase-Präparat anderer Herkunft untersucht. Dabei läßt sich gleichzeitig feststellen, ob die beiden Fermente identisch sind.

An Stelle der Tomaten-Polyphenoloxydase wurde ein aus *Psalliota campestris* isoliertes lyophilisiertes Polyphenoloxydase-Präparat der Worthington Biochemical Corporation verwendet. Dieses Präparat war etwa 1000mal aktiver als unser Enzym.

Die Tabelle 5 gibt einen zu Tabelle 3 analogen Versuch wieder; nur wurde die Verfärbung entsprechend der höheren Aktivität des Präparates nach $1^1/_2$ und 8 Stunden geprüft. Die Konzentrationen bei Versuchsbeginn waren die folgenden: 10^{-3} molare Fusarinsäure; 0,5 ‰ Substrat, 0,5 ml Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,8; $2 \cdot 10^{-2}$ mg/ml Pilz-Polyphenoloxydase. Die Ergebnisse der beiden Versuche entsprechen sich. Die Hydrochinon- und die

Tabelle 5

Die Farbstoffbildung durch Pilz-Polyphenoloxydase in Phenollösungen

(10^{-3} molare Fusarinsäure; pH 5,8; Auswertung nach 1½ und 8 Stunden; ++ stark verfärbt, + verfärbt, ∓ schwach verfärbt, — nicht verfärbt)

Substrat		ungehemmt		durch Fusarinsäure gehemmt	
		1½ Std.	8 Std.	1½ Std.	8 Std.
Monophenole	Phenol	—	—	—	—
	p-Kresol	∓	+	—	∓
	Tyrosin	∓	++	—	∓
o-Diphenole	Katechol (Brenzkatechin)	++	++	+	++
	3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa)	+	++	∓	∓
	Protokatechusäure	∓	∓	—	—
	Kaffeesäure	++	++	+	+
	Chlorogensäure	+	+	—	—
p-Diphenol	Hydrochinon	—	—	—	—
Triphenol	Phloroglucin	—	—	—	—

Phenollösung werden bei höheren pH-Werten ebenfalls leicht verfärbt, wobei die Phenollösung bei Zusatz von Fusarinsäure farblos bleibt. Es darf daher angenommen werden, daß es sich bei den beiden Präparaten um ein und dasselbe Enzym handle, um die Polyphenoloxydase.

Die Pilz-Polyphenoloxydase läßt sich durch Fusarinsäure ebenfalls kompetitiv und pH-abhängig hemmen. Die bei zwei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen an Pilz-Polyphenoloxydase festgestellten Hemmungen sind von demselben Ausmaß wie die mit Tomaten-Polyphenoloxydase erzielten und im 4. Abschnitt beschriebenen Wirkungen (Tab. 6). Auch für die Konstanten K_i und K_s ergeben sich vergleichbare Werte um $5 \cdot 10^{-5}$ bzw. 10^{-3} Mol/Liter.

Tabelle 6

Die Hemmung der Pilz-Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure
(Hemmung des Sauerstoffverbrauches in %; Mittel aus 2 bis 3 Versuchen)

Mol/Liter Fusarinsäure		p-Kresol		
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$
pH 6,1	10^{-4}	39,3	36,5	
	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	60,1	54,4	44
	$5 \cdot 10^{-4}$	78,5	65	59,9
pH 7,5	10^{-4}	16	13	6
	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	21,5	17	13,2
	$5 \cdot 10^{-4}$	27	23	18,5

IV. KAPITEL

Die Hemmung der Polyphenoloxydase durch Modellsubstanzen

1. Die Hemmung durch 4-Chlororesorcinol und Natrium-Diäthyldithiocarbamat

Tamari und Kaji (1952, 1953, 1954) und Deuel (1954) nehmen an, die Fusarinsäure wirke durch Chelierung von Schwermetallionen. Auch Gäumann (1958) erklärt die pleiotropen Eingriffe der Fusarinsäure teilweise mit der Fähigkeit des Toxins, Schwermetalle der verschiedensten Enzymsysteme zu binden. Daher wurde ein bekannter Kupferkomplexbildner, Natrium-Diäthyldithiocarbamat, und ein als Inhibitor der Polyphenoloxydase beschriebenes Diphenol, 4-Chlororesorcinol (Kull, Grimm und Mayer 1954, Heymann, Rogach und Mayer 1954), auf ihre Wirkung gegenüber unserem Enzympräparat untersucht.

Beide Substanzen hemmen die Oxydation des p-Kresols kompetitiv. Bei der Hemmung durch Na-Diäthyldithiocarbamat nimmt jedoch der reziproke Wert der Reaktions-

geschwindigkeit mit steigenden Mengen nicht linear zu. Also gilt in diesem Fall für die Gleichung 4 die allgemeinere Form:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_s}{V}\left[1 + \frac{(I)^n}{K_i}\right]\frac{1}{(S)} + \frac{1}{V}$$

da mehrere, nämlich n Moleküle des Inhibitors mit einem Enzymmolekül eine Verbindung eingehen. Eine genauere Bestimmung der Zahl n lag nicht im Rahmen dieser Arbeit; doch scheint, nach einigen wenigen Versuchen bei pH 7,2 zu urteilen, n = 2 und $K_i = 6$ bis $7 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter zu sein.

Für 4-Chlororesorcinol ist der Exponent n wie bei der Fusarinsäure gleich 1 und K_i etwas kleiner als 10^{-5} Mol/Liter. Da das Kupfer sich an der Enzym-Substrat-Bindung beteiligt, konkurrieren sowohl Komplexbildner wie auch solche Stoffe, die dem Substrat strukturell ähnlich sind, mit dem Phenol um den Platz am Enzym und hemmen es somit kompetitiv. Als Komplexbildner vermag Diäthyldithiocarbamat auch andere kupferhaltige Enzyme wie die Ascorbinsäureoxydase zu beeinflussen. Wollte man jedoch von einem Chelierungseffekt der Fusarinsäure gegenüber der Polyphenoloxydase sprechen, so sollte das Toxin zum mindesten auch andere kupferhaltige Fermente im entsprechenden Konzentrationsbereich hemmen. Die im II. Kapitel beschriebene blockierende Wirkung hochkonzentrierter Fusarinsäure gegenüber der kupferhaltigen Ascorbinsäureoxydase sowie den beiden eisenhaltigen Fermenten Katalase und Cytochromoxydase (Paquin und Waygood 1957) mag wohl auf einer Komplexbildung beruhen. Die dazu notwendigen großen Mengen an Toxin lassen jedoch eine Chelierung als einzige Ursache der Krankheitssymptome als unwahrscheinlich erscheinen. Die Bildung des Fusarinsäure-Polyphenoloxydase-Komplexes beruht nicht allein auf einer Bindung des Toxins an das Kupfer des Enzyms; es tragen sicher weitere spezifische Eigenschaften der beiden Partner dazu bei.

2. Die Wirkung von Pyridinverbindungen, die der Fusarinsäure ähnlich gebaut sind

Bachmann (1956, 1957) untersuchte im Zusammenhang mit dem Einfluß der Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten auch einige andere Pyridinderivate. Sie stellt fest, daß alle geprüften Derivate sowie Pyridin selbst die Wasserdurchlässigkeit der Plasmamembran im Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-8} Mol/Liter erhöhen. Bei Konzentrationen von 10^{-4} Mol/Liter und mehr übt Pyridin keinen Einfluß aus, hingegen läßt sich in diesem Konzentrationsbereich bei substituierten Pyridinverbindungen mit zunehmender Länge der Seitenkette in 3- (oder β-) Stellung wiederum eine Veränderung der Deplasmolysezeit beobachten. Die Säuregruppe in α-Stellung ist in diesen Versuchen ohne Bedeutung; denn α-Picolinsäure in gleicher Konzentration wirkt auf die Wasserpermeabilität nicht ein. Auch in anderen biologischen Tests wurden Pyridinderivate geprüft — die Resultate sind in Tabelle 8 zusammengestellt —, und die nächste Versuchsfrage lautet daher: Welche Pyridinverbindungen vermögen die Poly-

phenoloxydase zu hemmen, und wieweit ergeben sich Parallelen zu den anderen Testresultaten? Als Substrat diente immer p-Kresol.

Der qualitative Test ist für diese Untersuchung wenig geeignet. Die Farbstoffbildung ist primär durch die Oxydation des Phenols bedingt, das Pigment aber entsteht erst über weitere Zwischenstufen durch Polymerisation. Eine geringe Farbintensität muß daher nicht allein von einer Hemmung der Polyphenoloxydase herrühren. Ist einer der nachfolgenden Reaktionsschritte unterbunden, so unterbleibt die Bildung eines Farbstoffs und eine Hemmung der Enzymaktivität wird vorgetäuscht. Dieser Fall trifft für die Nicotinsäure zu (Tab. 7). Sie verhindert eine intensive Verfärbung, beeinflußt jedoch den Sauerstoffverbrauch nicht. Wahrscheinlich verbindet sie sich mit einem auf die Oxydation folgenden Zwischenprodukt, so daß eine Polymerisation nicht mehr möglich ist. Keine oder nur sehr geringe Hemmung der Farbstoffbildung läßt sich mit 3n-Hexylpyridin, Isonicotinsäure und Nicotinsäureamid feststellen. Es erübrigt sich daher, den Einfluß dieser Stoffe auf die Oxydation auch manometrisch zu prüfen. Pyridin, 3-Äthylpyridin und 3n-Butylpyridin führen nur anfänglich eine gegenüber der Kontrolle verminderte Farbintensität herbei; nach $3^1/_2$ Stunden war dieser Unterschied nicht mehr festzustellen. Mißt man den Sauerstoffverbrauch bei Zusatz dieser Stoffe, so kann man eine Verlängerung der Induktionsperiode beobachten. Der Sauerstoffverbrauch setzt erst längere Zeit (20 bis 30 Minuten) nach Versuchsbeginn ein; doch erreicht

Tabelle 7

Der Einfluß einiger Pyridinverbindungen auf die Kresolase-Aktivität und die Pigmentbildung bei pH 6

	Konzentration in Mol/Liter, bei der die Verfärbung deutlich gehemmt ist	Konzentration in Mol/Liter, bei der die Induktionszeit verlängert ist	K_i in Mol/Liter (Mittel aus 5 Versuchen)	Inaktivierung der Polyphenoloxydase
Pyridin	10^{-2}	10^{-2} schwach	$> 10^{-2}$	
3-Äthylpyridin	10^{-2}	10^{-2}		
3n-Butylpyridin	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$ schwach	$> 5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$ schwach
3n-Hexylpyridin	10^{-2} schwach	—		
Isonicotinsäure	10^{-2} schwach	—	$> 5 \cdot 10^{-3}$	
Nicotinsäure	10^{-3}	$7 \cdot 10^{-3}$ schwach	$> 5 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-3}$ negativ
Nicotinsäureamid	10^{-2} schwach	—	$> 5 \cdot 10^{-3}$	
α-Picolinsäure	$5 \cdot 10^{-4}$	—	$(7{,}3 \mp 1{,}0) \cdot 10^{-5}$	+
5-Methylpicolinsäure	$5 \cdot 10^{-4}$			
5-Äthylpicolinsäure	$5 \cdot 10^{-4}$	—	$(4{,}6 \mp 0{,}8) \cdot 10^{-5}$	+
5n-Butylpicolinsäure (Fusarinsäure)	10^{-4}	—	$(2{,}9 \mp 0{,}5) \cdot 10^{-5}$	+

— Induktionszeit nicht verlängert, + Inaktivierung.

er nach diesem Zeitpunkt dieselbe Geschwindigkeit wie die unbeeinflußte Kontrolle. Eine Hemmung des Sauerstoffverbrauches tritt nur bei Zusatz von α-Picolinsäure und 5-Äthylpicolinsäure auf. 5-Methylpicolinsäure konnte infolge Substanzmangels nur im qualitativen Test geprüft werden, wo sie die Verfärbung deutlich hemmt.

Eine Hemmwirkung auf die Polyphenoloxydase ist nur der α-Picolinsäure und ihren 5-Alkyl-Derivaten zuzusprechen. Wie aus den in Tabelle 7 aufgeführten Werten für die Dissoziationskonstanten K_i hervorgeht, ist die α-Picolinsäure weniger wirksam als die 5-Äthylpicolinsäure, und diese wiederum zeigt geringere Wirkung als die Fusarinsäure. Die Hemmung der Polyphenoloxydase durch 5-Alkylpicolinsäure vergrößert sich also mit zunehmender Länge der aliphatischen Seitenkette des Inhibitors.

Diese für die 3-Alkylpyridine (Bachmann 1956) und die 5-Alkylpicolinsäuren festgestellte Zunahme der phytotoxischen Aktivität mit zunehmender Seitenkettenlänge bis zu einem Optimum ist auch anderweitig bekannt (Sexton 1958). Sie ist wahrscheinlich durch Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Diffusionsvermögen, Oberflächenaktivität) der substituierten Stoffe bedingt.

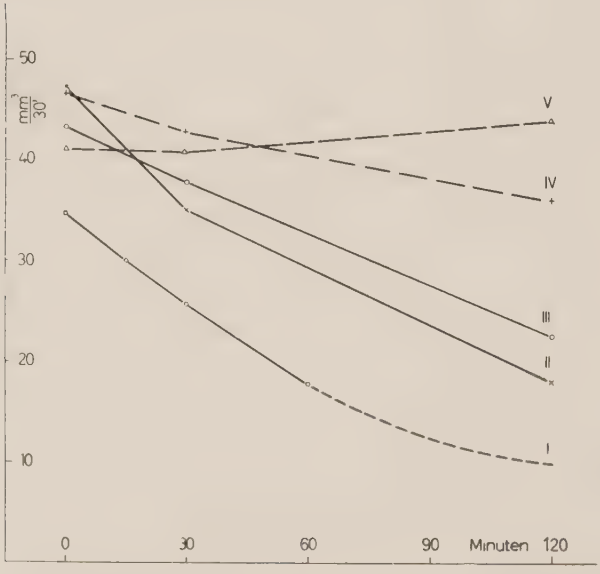


Abb. 17. Die Abhängigkeit der Kresolase-Aktivität von der Einwirkungsdauer einiger Pyridinverbindungen (p-Kresol 10^{-2} molar; pH 6). Ordinate: Sauerstoffverbrauch in mm^3 je 30 Min. Abszisse: Einwirkungsdauer in Minuten.

I 10^{-4} molare Fusarinsäure.
II $2{,}3 \cdot 10^{-4}$ molare 5-Äthylpicolinsäure.
III $3{,}7 \cdot 10^{-4}$ molare α-Picolinsäure.
IV $5 \cdot 10^{-3}$ molares Butylpyridin.
V $7 \cdot 10^{-3}$ molare Nicotinsäure.

Prüft man den Einfluß, den Pyridinverbindungen vor Reaktionsbeginn, also vor der Zugabe des Substrates auf das Enzym ausüben, so nimmt in Anwesenheit von α-Picolinsäure und Äthylpicolinsäure die Aktivität des Enzympräparates ähnlich wie bei Fusarinsäure mit der Zeit rasch ab, in 2 Stunden um 35 bis 50 %. Butylpyridin inaktiviert nur schwach, während mit Nicotinsäure die Aktivität konstant bleibt (Abb. 17).

In Tabelle 8 sind verschiedene Resultate von biologischen, mit Pyridinverbindungen durchgeführten Tests zusammengestellt. Bei ihrer Durchsicht

fällt auf, daß α-Picolinsäure in allen aufgeführten Versuchen wirksam ist, bis auf eine Ausnahme: die Deplasmolysezeit pflanzlicher Protoplasten wird durch die Säure nicht beeinflußt; die Carboxylgruppe in α-Stellung vermag die Wasserpermeabilität nicht zu beeinflussen (BACHMANN 1956). Für die Wirkung von Pyridinverbindungen auf den Gaswechsel von Hefezellen, auf die Keimung von *Ustilago*-Sporen und auf die Aktivität der Polyphenoloxydase ist diese Säuregruppe aber von Bedeutung. Weiter sprechen zwei Erscheinungen, nämlich die Störung der Transpiration und die Bildung von Nekrosen an Tomaten, sowohl auf die α-Picolinsäure an, wie auch auf das 3 n-Butylpyridin, dem die Carboxylgruppe fehlt.

Tabelle 8

Die Wirkung einiger Fusarinsäure-homologer Pyridinverbindungen in verschiedenen biologischen Tests*)

	1	2	3	4	5		6	
	Dissoziationskonstante K_i mit Polyphenoloxydase	Hemmung des Gaswechsels von Hefezellen	Keimung der *Ustilago*-Sporen, LD_{50}	Änderung der Transpiration von Tomaten	Welketest an Tomaten, Dosis minima		Deplasmolysezeit bei Konzentrationen von $> 10^{-5}$ Mol/Liter von:	
					Blatt	Stengel	*Rhoeo* erhöht	*Spirogyra* vermindert
Pyridin	—		—	—	>2000	>2000	—	—
3-Äthylpyridin	—		—				++	++
3 n-Butylpyridin	—	—	—	+++	800	280	+++	+++
3 n-Hexylpyridin	—						+++	++++
Isonicotinsäure	—	—	$> 5 \cdot 10^{-2}$	++	360	>1300	+++	—
Nicotinsäure	—	—	$> 5 \cdot 10^{-3}$	—	>1300	>1300	—	—
Nicotinsäureamid	—	—		—	>1200	>1200	—	—
α-Picolinsäure	$7{,}3 \cdot 10^{-5}$	++	$5{,}6 \cdot 10^{-3}$	++	300	> 700	—	—
5-Methylpicolinsäure	+	+	$5{,}8 \cdot 10^{-4}$		300	> 700	—	—
5-Äthylpicolinsäure	$4{,}6 \cdot 10^{-5}$	++	$4{,}0 \cdot 10^{-4}$		240	> 800	∓	
5 n-Butylpicolinsäure (Fusarinsäure)	$2{,}9 \cdot 10^{-5}$	+++	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	+++	160	160	+++	+++

— keine Reaktion, ± bis ++++ schwache bis starke Reaktion.

*) 2 und 5: Unveröffentlichte Resultate, mitgeteilt von Frau Dr. ST. NAEF-ROTH, 4: GÄUMANN, KERN, SCHÜEPP und OBRIST 1958. 6: BACHMANN 1956, 1957. 3: Für die α-Picolinsäure und die Äthylpicolinsäure stimmen die Resultate des *Ustilago*- und Welketestes nicht mit den bei GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL (1952) aufgeführten Werten überein, was von Unterschieden in der Versuchsanordnung und in der Reinheit der Substanzen herrühren mag.

Daraus läßt sich schließen: Die Fusarinsäure übt ihren Einfluß in Konzentrationen von 10^{-4} Mol/Liter und höher auf mindestens zwei Wegen aus (die Erhöhung der

Wasserpermeabilität durch sehr kleine Toxinmengen [Bachmann 1956, 1957] bleibt unberücksichtigt). Der erste Wirkungsweg, der unabhängig von der Carboxylgruppe in α-Stellung zustande kommt, führt zu einer Störung der Wasserpermeabilität und somit des Wasserhaushaltes und zur Bildung von Nekrosen an Tomatenpflanzen. Der zweite Eingriff, an dessen Zustandekommen die Säuregruppe in α-Stellung beteiligt ist, hat eine Hemmung des Gaswechsels von Hefezellen und der Keimung von *Ustilago*-Sporen, aber auch Störungen der Transpiration und Welkeerscheinungen an Tomaten zur Folge.

Es stellt sich nun die Frage, wo und wie das Toxin in den beiden aufgeführten Fällen angreift. Sanwal (1956 a) stellte an Tomatenpflanzen, die mit radioaktiver, in der Carboxylgruppe markierter Fusarinsäure vergiftet wurden, fest, daß etwa 10 % der Radioaktivität im Kohlendioxyd wieder ausgeatmet werden. Er nimmt an, Fusarinsäure werde zu 3 n-Butylpyridin decarboxyliert. Bisher gelang es jedoch nicht, in der Pflanze Butylpyridin nachzuweisen. Die Hypothese, daß der eine Eingriff durch dieses Abbauprodukt der Fusarinsäure verursacht sei, entbehrt noch der Beweise. Die zweite Wirkung der Fusarinsäure, an deren Zustandekommen die Carboxylgruppe beteiligt ist, könnte von der Hemmung der Polyphenoloxydase herrühren. Diese Möglichkeit wird im nächsten Kapitel diskutiert.

V. KAPITEL

Die Polyphenoloxydase-Hemmung durch Fusarinsäure und ihre Bedeutung für die Schadwirkung an Tomatenpflanzen

Wie wir gesehen haben, ist die Fusarinsäure zu einer Mehrzahl von Eingriffen in den Stoffwechsel der Tomate befähigt; sie wirkt pleiotrop (Gäumann 1958). Es stellt sich nun die Frage, ob und in welcher Weise die in vitro festgestellte Hemmung der Polyphenoloxydase am Zustandekommen dieser Schädigungen in vivo beteiligt ist.

1. Die Wirkung der Fusarinsäure auf verschiedene pflanzliche Versuchsobjekte

Wie schon früher dargelegt wurde, muß die primäre Störung eines Enzymsystems zumindest bei derselben Toxinkonzentration zustande kommen wie die davon abhängigen sekundären Erscheinungen. In Tabelle 9 sind Resultate von Versuchen, die mit Fusarinsäure an verschiedenen biologischen Objekten durchgeführt wurden, so zusammengestellt, daß die wirksame Toxinkonzentration von oben nach unten abnimmt. Da das Eindringungsvermögen pH-abhängig ist, die Fusarinsäure also nur im undissoziierten Zustand in die Zelle gelangt (Reusser und Naef-Roth 1956), wurden die Toxinkonzentrationen auf undissoziierte Fusarinsäure umgerechnet oder soweit als möglich bei pH 5 bis 6 gemessene Werte aufgeführt.

Tabelle 9

Die Wirkung der Fusarinsäure auf verschiedene physiologische Vorgänge pflanzlicher Versuchsobjekte

Versuchsobjekt	Wirkung	Konzentration in Mol/Liter	pH	Literatur
Tomate, Katalase	50 % Hemmung	$2 \cdot 10^{-2}$	5,5 bis 7,0	
Tomate, Ascorbinsäureoxydase	50 % Hemmung	10^{-2}	6	
Tomate, Cytochromoxydase	85 % Hemmung	10^{-2}	7	Paquin and Waygood 1957
Tomate, Bernsteinsäure-oxydase-System	50 % Hemmung	$7 \cdot 10^{-3}$	7	Paquin and Waygood 1957
Hefe, endogene Atmung	50 % Hemmung	$6 \cdot 10^{-3}$	4,5	Reusser und Naef-Roth 1956
Tomate, Blattgewebe, Atmung	50 % Hemmung	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	undiss.	Naef-Roth und Reusser 1954
Hefe, Glukose-Veratmung, CO_2-Abgabe	50 % Hemmung	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$	undiss.	Reusser und Naef-Roth 1956
Hefe, Glukose-Gärung	50 % Hemmung	10^{-3}	undiss.	Reusser und Naef-Roth 1956
Spirogyra, Deplasmolysezeit	abnehmend	$> 10^{-3}$	etwa 5,3	Bachmann 1956
Hefe, Wachstum	50 % Hemmung	10^{-3}	5,5	Braun, R., nicht publ. Angabe
Hefe, Glukose-Veratmung, O_2-Aufnahme	50 % Hemmung	$7 \cdot 10^{-4}$	undiss.	Reusser und Naef-Roth 1956
Escherichia coli	Wachstumsgrenze	$3{,}1 \cdot 10^{-4}$	—	Gäumann, Naef-Roth, Kobel 1952
Bacillus subtilis	Wachstumsgrenze	$3{,}1 \cdot 10^{-4}$	—	Gäumann, Naef-Roth, Kobel 1952
Bacillus megatherium	Wachstumsgrenze	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	—	Gäumann, Naef-Roth, Kobel 1952
Paratuberkelbacillus	Wachstumsgrenze	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	—	Gäumann, Naef-Roth, Kobel 1952
Ustilago-Sporen, Keimung	50 % Hemmung	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	6	
Rhoeo, Deplasmolysezeit	zunehmend	$> 10^{-4}$	5,3	Bachmann 1956
Tomate, Polyphenoloxydase	50 % Hemmung	$5 \cdot 10^{-5}$	5,8	
Tomate, Deplasmolysezeit	zunehmend	$> 10^{-5}$	—	Gäumann und Loeffler 1957
Tomate, Deplasmolysezeit	optimale Abnahme	10^{-6}	—	Gäumann und Loeffler 1957
Spirogyra, Deplasmolysezeit	optimale Abnahme	10^{-6}	unabh.	Bachmann 1956
Rhoeo, Deplasmolysezeit	optimale Abnahme	10^{-7}	unabh.	Bachmann 1956

Da durch $5 \cdot 10^{-5}$ molare Fusarinsäure eine 50%ige Hemmung der Polyphenoloxydaseaktivität zustande kommt und bei allen übrigen experimentellen Befunden nur höhere oder zum mindesten vergleichbare Toxinkonzentrationen die verschiedenen Schädigungen hervorzurufen vermögen, scheint eine Blockierung der Polyphenoloxydase als auslösender Faktor für alle geprüften physiologischen Vorgänge möglich. Nur die Erhöhung der Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten kommt bei noch geringeren Fusarinsäurekonzentrationen zustande. Es handelt sich dabei jedoch um eine Fähigkeit, die allen Pyridinverbindungen zukommt (Bachmann 1957) und die mit der Wirkung auf das Enzym nicht gekoppelt sein kann. Als Ursache der durch Fusarinsäure ausgelösten Krankheitserscheinungen ist also eine Hemmung der Polyphenoloxydase denkbar.

2. Die Polyphenoloxydase-Aktivität in der Tomatenpflanze

Die in den Versuchen benutzten Polyphenoloxydase-Präparate stammten immer aus der Wurzel und Stengelbasis von Tuckswood-Tomaten; die Welkeerscheinungen aber treten an den Stengeln und Blättern auf. Es wurde daher manometrisch die Aktivität von Homogenisaten verschiedener Pflanzenteile bestimmt. Je 8 g frisches Gewebe wurden in 20 ml Phosphat-Citrat-Puffer vom pH 7 aufgearbeitet. Gleiche Mengen Blatt-, Stengel- und Wurzelgewebe ergaben ein Verhältnis an Aktivität von 3 : 1 : 160. Das Trockengewicht aller drei Gewebsarten war annähernd gleich groß, die Sauerstoffquotienten Q_{O_2} somit gleich 1,5 für Stengel-, 4,5 für Blatt- und 240 mm^3/mg Std. für Wurzelgewebe. Eine Polyphenoloxydase-Aktivität ist auch in Blättern und Stengeln der Tomatenpflanzen festzustellen, doch ist sie im Wurzelgewebe von viel größerem Ausmaß.

3. Die Bedeutung der Polyphenoloxydase

Leider wissen wir über die Rolle der Polyphenoloxydase im Stoffwechsel der Pflanzen noch wenig. Bekannt ist die Verbräunung von Tabak- und Teeblättern oder von verletzten Geweben (z. B. der Kartoffelknolle und des Steinobstes). In allen diesen Fällen findet eine Oxydation der freiwerdenden Phenole statt, und es entstehen reaktionsfähige Chinone, die sich mit anderen Stoffwechselprodukten zu Farbstoffen umsetzen. Es handelt sich dabei um Vorgänge in der absterbenden Zelle.

Diskutiert wird auch, wie weit die Phenoloxydasen als terminale Oxydasen an der Endoxydation teilnehmen (James 1953 b). Wasserstoff könnte durch Chinone von Ascorbinsäure oder Codehydrase I (DPN) übernommen werden. Das dabei entstehende o-Diphenol würde durch die Polyphenoloxydase wieder oxydiert, wobei der Sauerstoff direkt aus der Luft hinzutritt. Schwarze (1958) glaubt, die Polyphenoloxydase sei an der Endoxydation in der Pflanze nicht beteiligt. Als mögliche Ausnahme führt er unter anderem das Gewebe des Tomatenstengels an, wo 34 % des Sauerstoffverbrauchs durch ein kupferhaltiges Enzym bedingt sind (Link und Klein 1951; Link, Klein und Guzman-Barron 1952). Die Endoxydation in To-

matenwurzeln scheint jedenfalls nicht über das Bernsteinsäureoxydase-System zu gehen; denn die Atmung der Wurzeln wird durch Malonat, einen spezifischen Inhibitor der Bernsteinsäuredehydrase, nicht gehemmt (Henderson und Stauffer 1944). Auch die Blattrespiration der Tomatenpflanzen soll auf Malonat wenig empfindlich sein (Scheffer und Collins 1957); hingegen stellen Link, Klein und Guzman-Barron (1952) an Stengelgewebe eine Hemmung fest.

In der Hefe nimmt vor allem die Cytochromoxydase an der Endoxydation teil; dieses Enzym wird jedoch erst durch hohe Fusarinsäurekonzentrationen gehemmt (Paquin und Waygood 1957). Die Messungen wurden allerdings mit Cytochromoxydase aus Tomatenmitochondrien bei einem pH-Wert (pH 7) durchgeführt, der eine optimale Wirkung der Fusarinsäure nicht erwarten läßt. Sollte sich die geringe Toxizität für die Cytochromoxydase in weiteren Versuchen bestätigen, so ist denkbar, daß die Polyphenoloxydasehemmung durch Fusarinsäure zu einer Störung des Redoxpotentials und dadurch zu einer Gaswechselhemmung der Hefezellen führt.

Wie weit die Polyphenoloxydase an der Hydroxylierung aromatischer Verbindungen beteiligt ist (Mason 1955) und welche Bedeutung diesen Verbindungen im Stoffwechsel zukommt, ist noch wenig abgeklärt.

Auch bei der Abwehr von Infektionen scheinen die Phenoloxydasen eine Rolle zu spielen. Verschiedene Phenolkörper wirken auf Mikroorganismen toxisch. Man stellt sich vor, daß sie in verletzten oder durch Mikroorganismen geschädigten Zellen gebildet werden (Farkas und Király 1958; Király und Farkas 1959). Da die Polyphenoloxydase offenbar auch bei der Ligninbildung eine Rolle spielt (Freudenberg 1949), so läßt sich eine Beteiligung an Abwehrreaktionen vorstellen, die schlußendlich zu einer Abgrenzung des Infektionsherdes führen.

Als Folge der Fusarinsäurewirkung auf die Polyphenoloxydase sind somit im pflanzlichen Körper mannigfache Schädigungen denkbar; wie weit diesen jedoch im Verlauf der Vergiftung eine entscheidende Bedeutung zukommt, läßt sich vorderhand noch kaum entscheiden. Zwei Teilfragen sollen im folgenden näher untersucht werden.

4. Die kompetitive Enthemmung

Da Fusarinsäure kompetitiv hemmt, sollte es möglich sein, das Ausmaß der Fermentblockierung durch Zugabe von Substrat zu verringern. Versuche in dieser Richtung führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Die in der Tomate als Substrat dienenden Stoffe sind noch nicht bekannt; die in unseren Versuchen verwendeten Substrate (p-Kresol, Katechol, Tyrosin und Dopa) sind an und für sich für die Testorganismen giftig (z. B. führen sie an Tomaten zu Welkeerscheinungen), und bei geringeren, somit untoxischen Substratkonzentrationen läßt sich der Fusarinsäureeffekt nicht mehr sichtbar vermindern. Eine Enthemmung tritt auch dann nicht auf, wenn man im Plattentest mit *Bacillus subtilis*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Escherichia coli*, *Candida vulgaris* und *Saccharomyces cerevisiae* quer zu einem mit Fusarin-

säure getränkten Filterpapierstreifen einen mit Substrat getränkten Streifen legt (Bonifas 1952). Einzig die Fusarinsäurehemmung des Gaswechsels von Hefezellen (Reusser und Naef-Roth 1956) läßt sich durch Zusatz von Phenolen schwach beeinflussen. Doch wird auch der Hefegaswechsel an und für sich schon durch die geprüften Substrate vermindert, so daß nur entsprechend geringe Konzentrationen verwendet werden können. Die dabei zutage tretende Enthemmung ist jedoch von so geringem Ausmaß, daß sich die Ergebnisse statistisch nicht sichern lassen.

Hätte sich eine durch Fusarinsäure hervorgerufene Schädigung kompetitiv durch Phenole verringern lassen, so wäre sie mit Sicherheit von einer Hemmung der Polyphenoloxydase abzuleiten gewesen. Die negativen Versuchsresultate schließen diese Möglichkeit aus folgenden Überlegungen nicht aus: erstens konnte aus methodischen Gründen die Enthemmung durch Substrate nur bei geringen Phenolkonzentrationen gemessen werden. Zweitens könnte auf Grund der Polyphenoloxydasehemmung das Substrat angereichert werden bis zu Konzentrationen, die zu schädigen vermögen. Weitere Phenolgaben würden sodann wohl kompetitiv enthemmen, zugleich aber toxisch wirken. Nicht der Mangel an einem durch das Enzym gebildeten Produkt, sondern ein durch die Hemmung auf Nebenwege geratener Stoffwechsel wäre somit die Ursache der Schädigung. Nach Davis und Dimond (1954) entstehen durch die Tätigkeit der pektinabbauenden Enzyme in der erkrankten Pflanze vermehrt Phenole, denen die Autoren eine schädigende Wirkung zuschreiben. Unter diesen Annahmen führen zwei Toxine des *Fusarium lycopersici* denselben, somit verstärkten Effekt herbei. Während durch die Tätigkeit der pektinabbauenden Enzyme toxische Phenole entstehen, verhindert die Fusarinsäure den Abbau und somit ihre Entgiftung.

5. Die Wirkung der Fusarinsäure auf Abwehrreaktionen und Resistenz der Tomaten

Bei bestimmten Erreger-Wirt-Kombinationen wird das *Fusarium lycopersici* an der Ausbreitung in der Tomatenpflanze gehindert, und Krankheitserscheinungen werden nicht sichtbar. Dies beruht nicht auf einer geringeren Empfindlichkeit des Wirtes gegenüber den Toxinen des Erregers; denn sowohl anfällige wie resistente Tomatensorten reagieren gleicherweise auf rohe Kulturfiltrate (Gothoskar, Scheffer, Stahmann und Walker 1955) und auf die reinen Toxine des Pilzes (Kern 1952). Auch die Toxinbildung des *Fusarium lycopersici* in vitro zeigt keine Beziehung zur Pathogenität der betreffenden Stämme (Kern 1952). Heinze und Andrus (1945) kamen auf Grund von Pfropfversuchen zur Ansicht, das die Ausbreitungsresistenz beeinflussende Prinzip sei in den Wurzeln lokalisiert. Es soll aber auch in anderen Pflanzenteilen wirksam (Scheffer und Walker 1954) und mit dem Stoffwechsel der Pflanze eng verbunden sein (Gothoskar, Scheffer, Stahmann und Walker 1955). Auf einen solchen Zusammenhang weisen auch Befunde an unterschiedlich ernährten Tomaten hin. Normal ernährte Tomaten sind am anfälligsten gegenüber dem Pilz (Walker und Foster 1954) und am empfindlichsten gegenüber seinen Toxinen (Zähner 1955).

Da Äthanol, 2,4-Dinitrophenol, Thioharnstoff und Natrium-Diäthyldithiocarbamat die Ausbreitung des Erregers und die Symptomausprägung in resistenten Tomatenpflanzen ermöglichen, scheinen Atmung und Phosphatstoffwechsel mit der Resistenz in Zusammenhang zu stehen (Gothoskar, Scheffer, Stahmann und Walker 1955). Gegen eine Abhängigkeit der Ausbreitungsresistenz vom Tricarbonsäurezyklus sprechen drei Beobachtungen: erstens vermag Malonat (Bernsteinsäuredehydrase-Inhibitor) die Ausprägung der Krankheitssymptome an befallenen resistenten Tomaten nicht zu ändern; zweitens ist die Atmung der Blätter infizierter Pflanzen gegen Malonat wenig empfindlich, und drittens ist am Blattgewebe der befallenen Tomaten keine Entkoppelung der Phosphorylierung festzustellen (Scheffer und Collins 1957). Hingegen fällt auf, daß kupferenzymhemmende Stoffe wie Thioharnstoff und Diäthyldithiocarbamat die Anfälligkeit der Tomate erhöhen. Ähnliche Feststellungen machten Fuchs und Kotte (1954) an *Phytophthora*-infizierten Kartoffeln, wo ebenfalls Stoffe, die kupferhaltige Enzyme hemmen, die Resistenz vermindern. Die Polyphenoloxydase scheint in diesem Fall an der Abwehrreaktion beteiligt zu sein (Christiansen-Weniger 1956; Vörös, Király und Farkas 1957). Durch *Agrobacterium tumefaciens* Sm. et Town. an Tomaten erzeugte Tumoren weisen ebenfalls eine erhöhte Phenoloxydaseaktivität auf (Link und Klein 1951; Graffi, Parchwitz und Schneider 1954). Sanwal (1956 b) machte ähnliche Feststellungen an Tomaten, die mit *Fusarium lycopersici* infiziert waren. Die Fermentaktivität in den Blättern ist allerdings während der ersten drei Wochen nach der Infektion gegenüber gesunden Pflanzen geringer, doch steigt sie nach diesem Zeitpunkt bis auf das doppelte Ausmaß an, während sie in den Stengeln infizierter Tomaten stets die Werte der Kontrolle überragt. Auffallend ist auch die Parallele zwischen der Feststellung von Heinze und Andrus (1945), daß die Widerstandsfähigkeit durch ein in den Wurzeln der Tomatenpflanze lokalisiertes Prinzip bedingt sei, und dem Befund, daß sich der Hauptanteil der Polyphenoloxydase ebenfalls in den Wurzeln befindet.

Es ist also möglich, daß die bei einer Erkrankung einsetzenden Abwehrreaktionen der Tomatenpflanze mit der Wirkung der Polyphenoloxydase in Zusammenhang stehen. Daher stellt sich folgende Versuchsfrage: Vermag Fusarinsäure als Inhibitor des Enzyms die Abwehrreaktion resistenter Tomatenpflanzen zu beeinflussen?

Versuchsanordnung:

Gleichaltrige Pflanzen der resistenten Sorte Red Current im Vierblattstadium sowie als Kontrolle eine Serie der anfälligen Sorte Bonny Best wurden in eine Suspension von Myzel und Konidien des *Fusarium lycopersici* (R-5-6, ETH Stamm 4406) eingetaucht und wieder eingetopft. Je etwa 40 Pflanzen wurden jeweils unmittelbar vor der Infektion und nach zwei Wochen Inkubationszeit 15 Stunden lang in 10^{-4} molare Fusarinsäurelösung, die entsprechenden Kontrollen in Leitungswasser gestellt und wiederum eingetopft. Vier

Wochen nach der Infektion konnte das Ausmaß der Erkrankung an der Verbräunung der Leitbündel (4 = ganze Länge des Stengels, 1 = 1/4 des Stengels verbräunt) und an der Anzahl epinastischer und welker Blätter beurteilt werden. Tabelle 10 gibt im oberen Teil die Durchschnittswerte für die einzelne Pflanze wieder. Darunter ist jeweils die Anzahl gänzlich abgestorbener, visuell kranker und gesunder sowie die gesamte Anzahl der Versuchspflanzen aufgeführt. Die gesteigerte Ausprägung der Krankheitssymptome nach der Behandlung mit Fusarinsäure geht aus der Tabelle 10 deutlich hervor. Dabei fällt auf, daß der Einfluß des Toxins auf die einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich ist, bleiben doch 18 beziehungsweise 16 Individuen noch ohne sichtbare Schädigungen.

Da das *Fusarium lycopersici* resistente Tomaten wohl besiedeln, sich in ihnen aber nicht ausbreiten kann, so sollte die Erkrankung bei denjenigen Pflanzen stärker manifestiert werden, die erst nach der Besiedelung durch den Erreger mit Fusarinsäure behandelt wurden. Die Unterschiede in der Ausprägung der Symptome, je nachdem, ob die Fusarinsäurebehandlung vor oder nach der Infektion durchgeführt wird (letzte Kolonnen der Tab. 10), sind jedoch zu wenig deutlich, um die Theorie zu bestätigen.

Jedenfalls vermag Fusarinsäure die Ausbreitungsresistenz herabzusetzen, und es besteht die Möglichkeit, daß eine Hemmung der Polyphenoloxydase die Ursache dieser Resistenzveränderung ist. Auf Grund dieser Ergebnisse wird die nächste Versuchfrage folgendermaßen lauten: Beruht die unterschiedliche Resistenz einzelner Tomatensorten auf einer ungleichen Reaktionsweise ihrer Polyphenoloxydasen mit der Fusarinsäure oder auf einer verschieden großen Enzymaktivität?

In frischem Zustand eingewogene, gleiche Mengen Wurzelstücke von gleichaltrigen Pflanzen der Sorte Bonny Best (sehr anfällig), Tuckswood (anfällig) und Red Current (resistent) wurden homogenisiert und manometrisch die gehemmte und die ungehemmte Kresolaseaktivität bestimmt (Tab. 11).

Die Fusarinsäure hemmt alle drei aus verschieden anfälligen Tomaten gewonnenen Polyphenoloxydase-Präparate im selben Ausmaße. Eine Beziehung zwischen der Resistenz und der Wirkungsweise des Toxins gegenüber den Polyphenoloxydasen besteht folglich nicht.

Die ungehemmte Kresolaseaktivität der drei Präparate ist verschieden groß; sie verhält sich ungefähr wie 1 : 3 : 2 für Red Currant (resistent) : Tuckswood (anfällig) : Bonny Best (sehr anfällig). Die Wurzeln der Red Currant-Tomaten waren am schwächsten, diejenigen der Bonny Best am besten entwickelt, doch gleiche Mengen Frischgewicht entsprachen in diesem Versuch auch gleichen Mengen Trockengewicht. Jedenfalls läßt sich aus diesen wenigen Tastversuchen kein Zusammenhang zwischen der Resistenz und dem Gehalt an Polyphenoloxydase ablesen. Menon und Schachinger (1957) kamen auf Grund von recht unklaren Versuchen zum Schluß, der Polyphenoloxydasegehalt in der Tomate nehme mit der Resistenz der Pflanzen zu. Diese Annahme stützt sich auf Resultate von nur zwei Tomatensorten, Bonny Best und Tuckswood. Ihre an Blattgewebe

gemessenen Ergebnisse stimmen mit den hier aufgeführten, an Wurzelgewebe gemessenen Resultaten überein; doch weist in unseren Versuchen das Wurzelgewebe der zusätzlich geprüften Red Currant-Pflanzen wiederum eine geringere Aktivität auf. Die Theorie von MENON und SCHACHINGER kann daher nicht bestätigt werden.

Tabelle 10

Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Erkrankung resistenter, mit *Fusarium lycopersici* infizierter Tomatenpflanzen

	Bonny Best	Red Currant				
	infiziert	nicht infiziert		infiziert		
	unbehandelt	unbehandelt	mit Fusarinsäure behandelt	unbehandelt	vor Infektion mit Fusarinsäure behandelt	14 Tage nach der Infektion mit Fusarinsäure behandelt
Verbräunung des Stengels je Pflanze	2,43	0	0	0,025	0,6	0,47
Anzahl epinastischer Blätter je Pflanze	2,64	0,12	0,1	0,74	0,92	0,91
Anzahl nekrotischer Blätter je Pflanze	0*	0	0	0	0,25	0,42
Anzahl Blätter ohne Symptome je Pflanze	3,7*	7,9	8,3	8,2	7,1	7,2
Anzahl ganz abgestorbener Pflanzen	2	0	0	2	1	4
Anzahl Pflanzen mit Symptomen	25	4	3	8	22	27
Anzahl Pflanzen ohne Symptome	1	37	37	29	18	16
Anzahl Versuchspflanzen total	28	41	40	39	41	47

*) Die Pflanzen der Sorte Bonny Best hatten einen Großteil ihrer Blätter verloren.

Tabelle 11

Die Hemmung der Polyphenoloxydasen verschieden resistenter Tomatenpflanzen durch Fusarinsäure

(1 ‰ p-Kresol; pH 6,5; Hemmung der Sauerstoffaufnahme in %; Mittel aus zwei bis drei Werten)

	Fusarinsäure Mol/Liter		
	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$7{,}5 \cdot 10^{-4}$
Red Currant (resistent)	64	67	79
Tuckswood (anfällig)	64	72	80,5
Bonny Best (sehr anfällig)	59	68	78,5

Die vom Erreger auch in vivo produzierte Fusarinsäure (Kern und Kluepfel 1956) hemmt die Aktivität der Polyphenoloxydase. Wie wir gesehen haben, besteht die Möglichkeit, daß dieses Enzym seinerseits an der Abwehrreaktion des Wirtes gegenüber dem Erreger beteiligt ist, wobei die Vorgänge im einzelnen noch der Abklärung bedürfen. Ob als Folge dieser Fermenttätigkeit ein für den Erreger toxischer Stoff in der Tomate gebildet wird, ist unsicher. Gottlieb (1943) und Irving (1947) fanden in vitro in gesunden Pflanzen einen fungistatischen Stoff, dessen in vivo-Wirksamkeit aber bestritten wird (Snyder, Baker und Hansen 1946; Kern 1952). Falls ein Toxin als Resistenzfaktor in der Tomatenpflanze vorkommt, so ist es vermutlich sehr unstabil (Gothoskar, Scheffer, Stahmann und Walker 1955), oder es entsteht erst im Verlaufe der Erkrankung (Gäumann 1951, S. 371). Möglicherweise werden aber die Lebensbedingungen im Wirt als Folge der Infektion für den Erreger ungünstig, ohne daß ein spezifisches Fungizid vorhanden ist.

Alle Befunde deuten darauf hin, daß die Abwehrreaktionen der Tomate gegenüber dem *Fusarium lycopersici* durch Enzymsysteme geregelt werden; dabei scheint der Polyphenoloxydase eine besondere Bedeutung zuzukommen. Am Schlusse dieses Abschnittes soll daher das Resistenzproblem im Hinblick auf diese Zusammenhänge nochmals beleuchtet werden.

Für die unterschiedliche Resistenz können folgende Faktoren verantwortlich sein: 1. Die an der Abwehrreaktion beteiligten Enzymsysteme sind in resistenten Pflanzen wirksamer, 2. diese Enzymsysteme reagieren je nach Resistenz verschieden auf toxische Stoffwechselprodukte des Erregers, 3. der Wirt kann diese vom Erreger gebildeten Effektoren des Abwehrsystems je nach Resistenz verschieden stark inaktivieren.

Die erste Möglichkeit kann wiederum drei Ursachen haben: a) Die an der Abwehr beteiligten Enzyme liegen in resistenten Pflanzen in größerer Menge vor, b) sie können rascher gebildet werden, und c) die ihnen zukommenden Substrate sind je nach Resistenz besser verfügbar. Zu diesen fünf Punkten liegen zur Zeit die folgenden konkreten Befunde vor:

1 a). Es konnte nicht bestätigt werden (Menon und Schachinger 1957), daß die Polyphenoloxydase in gesunden resistenten Tomatenpflanzen in größerer Menge vorkommt als in anfälligen.

1 b). Wie Versuche von Sanwal (1956 b) zeigen, nimmt in infizierten Tomatenpflanzen der Gehalt an Polyphenoloxydase rascher zu als in gesunden.

1 c). Menon und Schachinger (1957) stellten in Tomatenpflanzen einen mit der Resistenz zunehmenden Gehalt an Phenolen fest. In resistenten Pflanzen steht daher dem Enzym mehr Substrat zur Verfügung.

2. Aus Tomatenpflanzen verschiedener Resistenz gewonnene Polyphenoloxydase-Präparate werden durch die Fusarinsäure gleicherweise gehemmt. Eine unterschiedliche, resistenzabhängige Reaktionsweise des Fermentes mit dem Toxin ist nicht festzustellen.

3. Wie Untersuchungen an Tomaten über die Inaktivierung der Fusarinsäure zeigen, können resistente Pflanzen das Toxin besser entgiften als anfällige (KLUEPFEL 1957).

Weitere Versuche müssen nun die Bedeutung der Polyphenoloxydase für die Resistenz beweisen. Erst dann kann entschieden werden, ob der Fusarinsäure als Wegbereiter des *Fusarium lycopersici* eine wesentliche Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung

1. Aus dem Gewebe von Tomatenpflanzen wurden Enzympräparate gewonnen und die Veränderungen ihrer Aktivität unter dem Einfluß von Fusarinsäure, einem Toxin des *Fusarium lycopersici* Sacc., verfolgt.

2. Fusarinsäure hemmt Katalase und Ascorbinsäureoxydase, jedoch nur bei sehr hohen Toxinkonzentrationen.

3. Fusarinsäure hemmt Polyphenoloxydase kompetitiv.

4. Die Fusarinsäurehemmung der Polyphenoloxydase ist pH-abhängig. Sie nimmt vom sauren gegen den neutralen Bereich hin ab.

5. In gleicher Weise wird aus *Psalliota campestris* (Worthington Biochemical Corporation) gewonnene Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure kompetitiv und pH-abhängig gehemmt.

6. Fusarinsäure hemmt die Polyphenoloxydase nicht nur, sondern vermag das Enzym mit der Zeit auch zu inaktivieren.

7. Auch α-Picolinsäure und 5-Äthylpicolinsäure hemmen und inaktivieren die Polyphenoloxydase, wobei die Hemmung weniger ausgeprägt, jedoch ebenfalls kompetitiv ist.

8. Die Hemmung der Polyphenoloxydase erfolgt mit so geringen Mengen Fusarinsäure, daß ein Zusammenhang mit der „in vivo-Wirkung" vorstellbar ist. Dies ist bei der Katalase und Ascorbinsäureoxydase nicht der Fall.

9. Die Bedeutung dieser Fermentblockierung durch Fusarinsäure für den Krankheitsablauf in der Tomatenpflanze wird diskutiert.

Summary

1. A study has been made of the effect of fusaric acid on the activities of enzyme preparations from tomato plant tissues. Fusaric acid is a toxin produced by *Fusarium lycopersici* Sacc.

2. Fusaric acid inhibits catalase and ascorbic acid oxidase only at very high toxin concentrations.

3. Fusaric acid competitively inhibits polyphenol oxidase.

4. The inhibition of the polyphenol oxidase by fusaric acid is dependent on pH. The inhibition decreases from the acidic towards the neutral range.

5. In the same way polyphenol oxidase, prepared from *Psalliota campestris* (Worthington Biochemical Corporation), is inhibited competitively and depending on pH by fusaric acid.

6. Fusaric acid does not only inhibit the polyphenol oxidase, but in time the toxin is also capable of inactivating the enzyme.

7. α-Picolinic acid and 5-ethylpicolinic acid inhibit the polyphenol oxidase too. This inhibiton is also competitive though less strong.

8. Polyphenol oxidase is inhibited by such small amounts of fusaric acid, that a connection with the in vivo effect of the toxin is quite conceivable. This is not so with the catalase and the ascorbic acid oxidase.

9. The significance is discussed of this enzyme inhibiton by fusaric acid during the course of the tomato wilt disease.

Herrn Prof. Dr. E. Gäumann, Direktor des Instituts für spezielle Botanik der ETH, möchte ich für die Ermöglichung dieser Untersuchungen herzlich danken. Für die Überlassung der Fusarinsäurepräparate sei Herrn Prof. Dr. E. Hardegger und Herrn Dr. Nikles (Organisch-chemisches Laboratorium der ETH) mein Dank ausgesprochen. Danken möchte ich auch Frau Dr. St. Naef-Roth und Herrn Dr. H. Kern für ihre wertvollen Anregungen und ihre stete Unterstützung.

Literaturverzeichnis

Aebi, H., 1956: Kinetik. In Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. S. 680—707. Verlag Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1332 S.

Bachmann, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

— —, 1957: Über den Einfluß von Pyridin und Pyridin-Derivaten auf die Wasserpermeabilität von *Spirogyra nitida* und *Rhoeo discolor*. Phytopath. Z. **29**, 177—184.

Bladergroen, W., 1955: Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge. Wepf und Co., Basel, 368 S.

Bonifas, V., 1952: Determination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experientia **8**, 234—235.

Christiansen-Weniger, E., 1956: Versuche zur stoffwechselbiologischen Beeinflussung der Reaktion der Kartoffelknolle auf *Phytophthora infestans* de By. Phytopath. Z. **25**, 153—180.

Davis, D., and A. E. Dimond, 1954: The source and role of phenols in *Fusarium* wilt symptoms. Phytopathology **44**, 485—486.

— —, P. E. Waggoner and A. E. Dimond, 1953: Conjugated phenols in the *Fusarium* wilt syndrome. Nature **172**, 959—961.

Deuel, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. Phytopath. Z. **21**, 337—348.

Dimond, A. E., and P. E. Waggoner, 1953: The cause of epinastic symptoms in *Fusarium* wilt of tomatoes. Phytopathology **43**, 663—669.

Dixon, M., 1953: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. **55**, 170—171.

Farkas, G. L., and Z. Király, 1958: Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes. Phytopath. Z. **31**, 251—272.

Freudenberg, K., 1949: Die Bildung ligninähnlicher Stoffe unter physiologischen Bedingungen. Sitzungsber. Heidelberger Akad. Wissensch. **5**, 151—157.

Fuchs, W. H., und E. Kotte, 1954: Zur Kenntnis der Resistenz von *Solanum tuberosum* gegen *Phytophthora infestans* de By. Naturwissenschaften **41**, 169—170.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 681 S.

— —, 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. Phytopath. Z. **29**, 1—44.

— —, 1957: Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology **47**, 342—357.

— —, 1958: Über die Wirkungsmechanismen der Fusarinsäure. Phytopath. Z. **32**, 359—398.

— —, 1958: The mechanisms of fusaric acid injury. Phytopathology **48**, 670—686.

— —, H. Kern, H. Schüepp und W. Obrist, 1958: Der Einfluß der Fusarinsäure auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse. Phytopath. Z. **32**, 225—244.

— —, und W. Loeffler, 1957: Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **28**, 319—328.

— —, St. Naef-Roth und H. Kobel, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.

— —, — — und G. Miescher, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257—288.

— —, Ch. Stoll und H. Kern, 1953: Über Vasinfuscarin, ein drittes Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 345—347.

Gothoskar, S. S., R. P. Scheffer, M. A. Stahmann and J. C. Walker, 1955: Further studies on the nature of *Fusarium* resistance in tomato. Phytopathology **45**, 303—307.

— —, — —, J. C. Walker, and M. A. Stahmann, 1953: The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 535—536.

Gottlieb, D., 1943: Expressed sap of tomato plants in relation to wilt resistance. Phytopathology **33**, 1111.

Graffi, A., H. K. Parchwitz und E. J. Schneider, 1954: Zytochrom- und Brenzkatechinoxydaseaktivität in pflanzlichen Geschwülsten und Normalgeweben. Arch. f. Geschwulstforschung **7**, 23—27.

Gregg, D. C., and J. M. Nelson, 1940: Further studies on the enzyme tyrosinase. J. Amer. chem. soc. **62**, 2500—2505.

Hardegger, E., und E. Nikles, 1957: Welkestoffe und Antibiotika. 21. Herstellung der Fusarinsäure aus 2,5-Lutidin. Helv. chim. Acta **40**, 2428—2433.

Heinze, P. H., and C. F. Andrus, 1945: Apparent localization of *Fusarium* wilt resistance in the Pan America Tomato. Amer. J. Bot. **32**, 62—66.

Henderson, J. H. M., and J. F. Stauffer, 1944: The influence of some respiratory inhibitors and intermediates on growth and respiration of excised tomato roots. Amer. J. Bot. **31**, 528—535.

Heymann, H., Z. Rogach and R. L. Mayer, 1954: A study of the kinetics of potato phenoloxidase inhibitors. J. Amer. chem. soc. **76**, 6330—6335.

Irving, G. W., 1947: The significance of tomatin in plant and animal disease. J. Washington Acad. Sci. **37**, 293—296.

James, W. O., 1953 a: The use of respiratory inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **4**, 59—90.

— —, 1953 b: Plant respiration. Clarendon Press, Oxford, 282 S.

Kern, H., 1952: Über die Beziehung zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. Phytopath. Z. **19**, 351—382.

— —, und D. Kluepfel, 1956: Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in vivo. Experientia **12**, 181—182.

Király, Z., and G. L. Farkas, 1959: Biochemical trends in plant pathology. Phytopath. Z. **34**, 341—364.

Kluepfel, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **29**, 349—379.

Kubowitz, F., 1937: Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase. Biochem. Z. **292**, 221—229.

Kull, F. C., M. R. Grimm and R. L. Mayer, 1954: Studies on inhibition of tyrosinase. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **86**, 330—332.

Lardy, H. A., 1950: Respiratory enzymes. 2. Aufl. Burgess Publ. Comp. Minneapolis, 290 S.

Linder, A., 1951: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 238 S.

Lineweaver, H., and D. Burk, 1943: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. chem. soc. **56**, 658—666.

Link, G. K. K., and R. M. Klein, 1951: Studies on the metabolism of plant neoplasms. The terminal oxidase patterns of crowngall and auxin tumors of tomato. Botan. Gaz. **113**, 190—195.

— —, — —, and E. S. Guzman-Barron, 1952: Metabolism of slices of tomato stem. J. exptl. Bot. **3**, 216—236.

Mason, H. S., 1955: Comparative biochemistry of the phenolase complex. Adv. Enzymology **16**, 105—184.

— —, 1956: Structures and functions of the phenolase complex. Nature **177**, 79—81.

McIlvaine, T. C., 1921: A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. **49**, 183—186.

Menon, R., und L. Schachinger, 1957: Die Rolle des Phenols bei der Widerstandsfähigkeit von Tomaten gegen Infektionen. Ber. dtsch. Bot. Ges. **70**, 11—20.

Naef-Roth, St., 1957: Über die parasitogenen und toxigenen Veränderungen der Atmungsintensität bei Tomaten. Z. f. Pflanzenkrh. **64**, 421—426.

— —, und P. Reusser, 1954: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von Tomatenblattgewebe. Phytopath. Z. **22**, 281—287.

Neufeld, H. A., F. M. Latterell, L. F. Green and R. L. Weintraub, 1958: Oxydation of meta-polyphenols by enzymes from *Piricularia oryzae* and *Polyporus versicolor*. Arch. Biochem. Biophys. **76**, 317—327.

Page, O. T., 1959: Fusaric acid in banana plants infected with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Phytopathology **49**, 230.

Paquin, R., and E. R. Waygood, 1957: The effect of *Fusarium* toxins on the enzymic activity of tomato hypocotyl mitochondria. Canad. J. Bot. **35**, 207—218.

Plattner, Pl. A., W. Keller und A. Boller, 1954: Welkestoffe und Antibiotika. 15. Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. Helv. chim. Acta **37**, 1379—1392.

Potter, V. R., and C. Elvehjem, 1936: A modified method for the study of tissue oxidations. J. Biol. Chem. **114**, 495.

Reusser, P., und St. Naef-Roth, 1956: Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. Phytopath. Z. **26**, 273—296.

Sanwal, B. D., 1956 a: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. Phytopath. Z. **25**, 333—384.

— —, 1956 b: Polyphenoloxidase and ascorbic acid oxidase activity in tomato plants infected with *Fusarium lycopersici* Sacc. Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B, **44**, 257—270.

Scheffer, R. P., and R. P. Collins, 1957: Pathological respiration in *Fusarium* infected tomato plants. Phytopathology **47**, 533.

— —, and J. C. Walker, 1954: Distribution and nature of *Fusarium* resistance in the tomato plant. Phytopathology **44**, 94—101.

Schwarze, P., 1958: Phenole und Chinone und die biogene Bildung von Benzolkernen bei höheren Pflanzen. In Ruhland, W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. **X**, 507—542.

Sexton, W. A., 1958: Chemische Konstitution und biologische Wirkung. Deutsche Übertragung. Verlag Chemie, Weinheim, 439 S.

Snyder, W. C., K. F. Baker and H. N. Hansen, 1946: Interpretation of resistance to *Fusarium* wilt in tomato. Science **103**, 707—708.

Sörensen, S. P. L., 1909: Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogènes dans les réactions enzymatiques. Comptes-rendues trav. lab. Carlsberg **8**, 1—168.

Stoll, Ch., J. Renz und E. Gäumann, 1957: Über die Bildung von Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure durch das *Fusarium lycopersici* Sacc. in saprophytischer Kultur. Phytopath. Z. **29**, 388—394.

Tamari, K., and J. Kaji, 1952: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. 1—5. J. agr. chem. soc. Japan **26**, 223—227, 295—298, 345—349, 349—353.

— —, and — —, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. 6—8. J. agr. chem. soc. Japan **27**, 245—249, 249—252, 302—306.

— —, and — —, 1954: Studies on the mechanism of the growth inhibitory action of fusarinic acid on plants. Jap. J. Biochem. **41**, 143—166, zit. nach Biol. Abstr. **29** (7), 14809, 1955.

Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer, 1949: Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 227 S.

Vörös, J., Z. Király and G. L. Farkas, 1957: Role of polyphenolase in streptomycin-induced resistance to *Phytophthora* in potato. Science **126**, 1178.

Waggoner, P. E., and A. E. Dimond, 1956: Polyphenol oxidases and substrates in potato and tomato stems. Phytopathology **46**, 494—497.

Walker, J. C., and R. E. Foster, 1954: Plant nutrition in relation to disease development. III. *Fusarium* wilt of tomato. Amer. J. Bot. **33**, 259—264.

Wellmann, F. L., 1939: A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato *Fusarium* wilt. Phytopathology **29**, 945—956.

Yabuta, T., K. Kambe and T. Hayashi, 1934: Biochemistry of the bakanaë-fungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanaë-fungus. J. agr. chem. soc. Japan **10**, 1059—1068; zit. nach Chem. Abstr. **29**, 1132, 1937.

Zähner, H., 1955: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **23**, 49—88.

Kurze Mitteilung

Aus der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil

Echter Mehltau auf Süßkirschen (*Prunus avium* L.) und Zwetschgen (*Prunus domestica* L.)

Von

S. Blumer

Mit einer Abbildung

In den letzten Jahren wurden von der Sektion Obstbau unserer Versuchsanstalt Embryokulturen von Süßkirschen- und Zwetschgenkreuzungen angelegt. Sobald diese Keimpflanzen vom Agar in sterile Erde verpflanzt wurden, trat sowohl im Gewächshaus als auch im Freien regelmäßig ein *Oidium* auf. Der Befall war so stark, daß die Blätter deformiert wurden und die Pflanzen eingingen (Abb.). Sie konnten nur durch regelmäßige Behandlungen mit Karathane gerettet werden.

In der europäischen Literatur sind Angaben über einen Mehltau auf *Prunus avium* außerordentlich spärlich. Nach Léveillé (1851) hat Mougeot in den Vogesen ein *Oidium* auf der Süßkirsche gefunden. Im Gebiet von Chamonix fand Eug. Mayor (1929) auf dieser Pflanze ein *Oidium*. Man vermutete, daß es sich in diesen Fällen um die auf *Prunus*-Arten verbreitete *Podosphaera tridactyla* (Wallr.) De Bary handeln könnte. Auch Jaczewski (1927) gibt auf *Prunus avium* diese Mehltau-Art an und daneben *Phyllactinia suffulta* (Rebent.) Sacc., die aber in unserem Falle nach der Form der Konidien nicht in Betracht kommt.

Auf *Prunus domestica* tritt *Podosphaera tridactyla* bei uns ziemlich häufig auf. Dagegen ist die auf *Prunus spinosa* L. und *Prunus cerasifera* Ehrh. verbreitete *Uncinula prunastri* (DC.) Schroet. auf Zwetschgen offenbar selten.

Wir suchten nun die Zugehörigkeit des *Oidiums* auf den Kirschen- und Zwetschgenkreuzungen mit Hilfe von Konidienmessungen und Infektionsversuchen zu klären. Zunächst wurde versucht, die beiden Oidien auf zwei- und dreijährige Kirschen- und Zwetschgensämlinge zu übertragen. Diese mehrfach wiederholten Versuche verliefen ohne Ausnahme negativ. Wir konnten ferner feststellen, daß die gleichen Pflanzen, die in ihren ersten Jugendstadien stark anfällig gegen Mehltau waren, später auch ohne Behandlung mehltaufrei blieben. Damit scheidet die Annahme, daß es sich um die auf *Prunus* verbreiteten Arten *Podosphaera tridactyla* oder *Uncinula prunastri* handeln könnte, aus.

Oidium auf Kirschensämlingen
Starker Befall auf der Unterseite der Blätter

Es blieb die Möglichkeit, daß irgendein in unseren Anlagen verbreitetes polyphages *Oidium* auf unsere Kirschen- und Zwetschgensämlinge übergegangen war. Zunächst suchten wir festzustellen, ob eine Identifikation mit Hilfe von Konidienmessungen möglich sei. Die in der Tabelle angegebenen Mittelwerte basieren auf 200 Messungen. In der Kolonne L/Br ist der Quotient Länge : Breite angegeben.

Nach der Konidiengröße bleiben *Erysiphe pisi*, *Uncinula prunastri*, *Podosphaera leucotricha* und vermutlich auch *Sphaerotheca macularis* (breite Konidien!) außer Betracht. Dagegen zeigen *Uncinula necator* und *Erysiphe polyphaga* auf Gurken ähnliche Konidienmaße wie die fraglichen Oidien. Infektionsversuche, in welche alle auf der Tabelle angeführten Wirtspflanzen einbezogen wurden, ergaben nur auf *Cucumis sativus* positive Ergebnisse. Leider konnte der reziproke Versuch nicht durchgeführt werden, weil keine mehltaufreien Kirschen- und Zwetschgenkeimpflanzen aus Embryokulturen zur Verfügung standen.

Für *Erysiphe polyphaga* Hammarlund sind bis jetzt mehr als 100 Wirtspflanzen aus verschiedenen Familien nachgewiesen. Wenn die Oidien auf

Keimpflanzen von Kirschen und Zwetschgen zu *Erysiphe polyphaga* gehören, so wäre zu erwarten, daß sie nicht nur auf den Hauptwirt, *Cucumis sativus*, sondern auch auf die von HAMMARLUND (1945) und mir (1952) nachgewiesenen Nebenwirte übergehen. Von diesen wurden *Nicotiana tabacum* L., *Petunia hybrida* hort. und *Valerianella olitoria* (L.) Pollich verwendet. Die drei Arten konnten von *Cucumis sativus* aus leicht infiziert werden, dagegen mißlangen alle Versuche, die Oidien der Kirschen- und Zwetschgen-Keimpflanzen auf diese Nebenwirte zu übertragen.

Vergleich der Konidiengröße
der auf Kirschen und Zwetschgen gefundenen Oidien mit Mehltau-Arten
auf benachbarten Pflanzen

Art	Wirtspflanze	Länge µ	Breite µ	L/Br
Erysiphe pisi DC.	*Pisum sativum* L.	37,1	15,4	2,41
Oidium sp. 1958	*Prunus domestica* L. (Fellenberg-Kreuzung)	33,3	15,7	2,12
Oidium sp. 1958	*Prunus avium* L. (Kreuzung)	33,1	17,3	1,91
Oidium sp. 1958	*Cucumis sativus* L. (von *Prunus avium* übertragen)	32,9	17,7	1,85
Oidium sp. 1958	*Cucumis sativus* L. (von *Prunus domestica* übertragen)	31,5	17,4	1,81
Oidium sp. 1956	*Prunus avium* L.	30,3	18,2	1,66
Uncinula necator (Schw.) Burr.	*Vitis vinifera* L.	31,9	17,1	1,86
Erysiphe polyphaga Hammarlund	*Cucumis sativus* L.	29,9	16,9	1,77
Sphaerotheca macularis (Wallr.) Jacz.	*Fragaria* cult.	29,3	20,1	1,46
Uncinula prunastri (DC.) Sacc.	*Prunus cerasifera* Ehrh.	25,5	13,5	1,88
Podosphaera leucotricha (Ellis et Everh.) Salm.	*Pyrus Malus* L.	23,7	15,1	1,57

Trotz dieser negativen und widersprechenden Versuchsergebnisse nehmen wir vorläufig an, daß die Oidien auf Süßkirschen und Zwetschgen zu *Erysiphe polyphaga* gehören. Es ist nicht ausgeschlossen, daß innerhalb dieser Art verschiedene Stämme mit abweichendem Wirtsspektrum bestehen. Ferner besteht die Möglichkeit, daß *Cucumis sativus* für die Oidien auf Süßkirschen und Zwetschgen die Rolle einer Bridging-Spezies für den Befall gewisser Nebenwirte spielen könnte.

Die Tatsache, daß diese Oidien nicht auf ältere Pflanzen übergehen und auch nicht auf junge Blätter von älteren Pflanzen, spricht für eine ontogenetisch bedingte Befallsresistenz im Sinne von GÄUMANN (1951). Da normal keimende Süßkirschen und Zwetschgen nicht vom Mehltau befallen werden, scheint es, daß die Embryokultur die Disposition für den Befall schafft.

Literaturverzeichnis

BLUMER, S., 1952: Beiträge zur Spezialisation der Erysiphaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **62**, 384—401.

GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel.

HAMMARLUND, C., 1945: Beiträge zur Revision einiger imperfekter Mehltau-Arten. *Erysiphe polyphaga* n. sp. Bot. Notiser 101—108.

JACZEWSKI, A. A., 1927: Karmanni opredelitel gribow. Leningrad.

LÉVEILLÉ, J. H., 1851: Organisation et disposition méthodique des espèces qui composent le genre *Erysiphe*. Ann. Sci. Nat., 3ième série **15**, 109—179.

MAYOR, E., 1929: Herborisations mycologiques dans la région de Chamonix (Haute-Savoie). Bull. Soc. Mycol. France **45**, 171—183.

Die Baumschule

Ein Handbuch für Anzucht, Vermehrung, Kultur und Absatz der Baumschulpflanzen

Von G. Krüssmann

2., neubearbeitete Auflage. 1954. 567 Seiten mit 359 Abbildungen. Ganzleinen DM 48,—

In engem Kontakt zwischen Wissenschaft und Praxis entstand dieses Werk. Es berücksichtigt die Erfahrungen zahlreicher Fachleute aus aller Welt und bietet jedem Obstbaubetrieb einen umfassenden, wissenschaftlich fundierten, aber praktisch anwendbaren Überblick über alle Fragen baumschulmäßiger Anzucht von Gehölzen. Die Kapitel über die Behandlung der verschiedenen Vermehrungs- und Veredlungsarten enthalten eine Fülle spezieller Angaben und Tabellen sowie einen Vermehrungskalender.

„Im speziellen Teil, der den größten Raum des Buches einnimmt, wird die Vermehrung der Zier- und Nutzgehölze, nach Gattungsnamen alphabetisch geordnet, im einzelnen besprochen, wobei u. a. die besonderen Standorts- und Kulturansprüche herausgestellt werden. Wichtige Literaturhinweise beschließen die einzelnen Kapitel. So ist das Werk ein unentbehrliches Handbuch für den Baumschuler, aber auch ein wertvoller Ratgeber für alle, die sich über einschlägige Fragen unterrichten wollen."

Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes

NEUERSCHEINUNG

Die Bastardierung in der Gattung Larix

Forstwissenschaftliche Forschungen Heft 12

Von Dr. R. Dimpflmeier

75 Seiten mit 16 Abbildungen. Kartoniert DM 16,50; für Abonnenten des Forstw. Centralbl. DM 13,20

In einem geschichtlichen Rückblick werden alle seit Beginn unseres Jahrhunderts durchgeführten Lärchenbastardierungsversuche geschildert sowie spontan entstandene Lärchenbastarde beschrieben. Auch eine Reihe von älteren Anbauversuchen mit schottischen Bastardlärchen und mit Lärchen aus gelenkten Kreuzungen mit europäischer und japanischer Lärche sind ausgewertet. Den größten Umfang der Schrift nehmen die eigenen Bastardierungsversuche des Verfassers aus dem Jahre 1951 ein. Im Exotenversuchsgelände Grafrath und auf einer Bastardlärchenversuchsfläche des Forstamtes Starnberg wurden durch gelenkte Kreuzungen 21 verschiedene Kombinationen hergestellt. Über 13 000 Versuchslärchen aus diesen gelenkten Kreuzungen und aus Nachkommenschaften 11 frei abgeblühter Lärchen wurden angebaut. In einer sechsjährigen Beobachtungszeit wurden mehr als 180 000 Einzelmessungen und Beobachtungen ausgewertet. Eine Vielzahl von Ergebnissen über die Arbeitsverfahren und Geräte, über den Bestäubungserfolg und die Samenausbeute werden mitgeteilt.

VERLAG PAUL PAREY / HAMBURG UND BERLIN

Obstbau

Grundlagen, Anbau und Betrieb

Von Prof. Dr. F. Hilkenbäumer

3., neubearbeitete Auflage. 1953. 367 Seiten mit 331 Abbildungen und 1 Farbtafel. Ganzleinen DM 28,—

In diesem bewährten und bekannten Werk wird das Gesamtgebiet des Obstbaues in einer glücklichen Verbindung von bestem handwerklichem Können und gründlichster Wissenschaftlichkeit — unter Zugrundelegung der Erfahrungen in den obstbautreibenden Ländern der Welt — lückenlos behandelt. Im einzelnen hervorgehoben sind die besondere Bedeutung der Wirkstoffe, die mineralische Ernährung, der Pflanzenschutz sowie die betriebswirtschaftlichen Probleme.

„Das vorliegende Werk ist zweifellos das beste deutsche Obstbau-Lehrbuch und ein Beweis für die vitale Aktivität unserer obstbaulichen Forschung überhaupt. Jedem, der sich nur irgendwie mit Obstbau beschäftigt, wird das Buch ein unentbehrlicher Ratgeber sein."
Gartenwelt

„Dieses Buch zählt zu den Standardwerken des Obstbaues. Es wendet sich ebenso an den Praktiker wie an den Wissenschaftler und ist durch seinen didaktisch klaren Aufbau besonders auch für den Lernenden im Obstbau geeignet." *Angewandte Botanik*

Krankheiten und Schädlinge im Obstbau

und ihre Bekämpfung

Von Prof. Dr. W. Kotte

3., neubearbeitete Auflage. 1958. 536 Seiten mit 233 Abbildungen und 8 mehrfarbigen Tafeln. Ganzleinen DM 54,—

Auf alle Fragen der Krankheits- und Schädlingserkennung und -bekämpfung im Obstbau gibt dieses Standardwerk eine zuverlässige und erschöpfende Antwort. Der Inhalt entspricht den Erkenntnissen neuzeitlicher Forschung und Praxis. Die reichhaltige Illustrierung einschließlich der Farbtafeln sichern ein einwandfreies Erkennen der Krankheiten und Schädlinge.

„Wenn aus der Vielfalt des Gebotenen kein langatmiges Handbuch wurde, so ist dies einzig das Verdienst Professor Kottes, der hiermit wieder ein hervorragendes Fachbuch schuf, das nicht nur fundiertes Wissen und eine wahre Fülle von Anregungen und Hinweisen vermittelt, sondern schon allein wegen seiner klaren und präzisen Ausdrucksweise jeden Leser fesselt." *Pflanzenschutzberichte*

„Der neue Kotte gilt als das beste deutschsprachige Werk auf dem Gebiet der Schädlingsbekämpfung in zusammengefaßter Form." *Der Landwirt*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG